

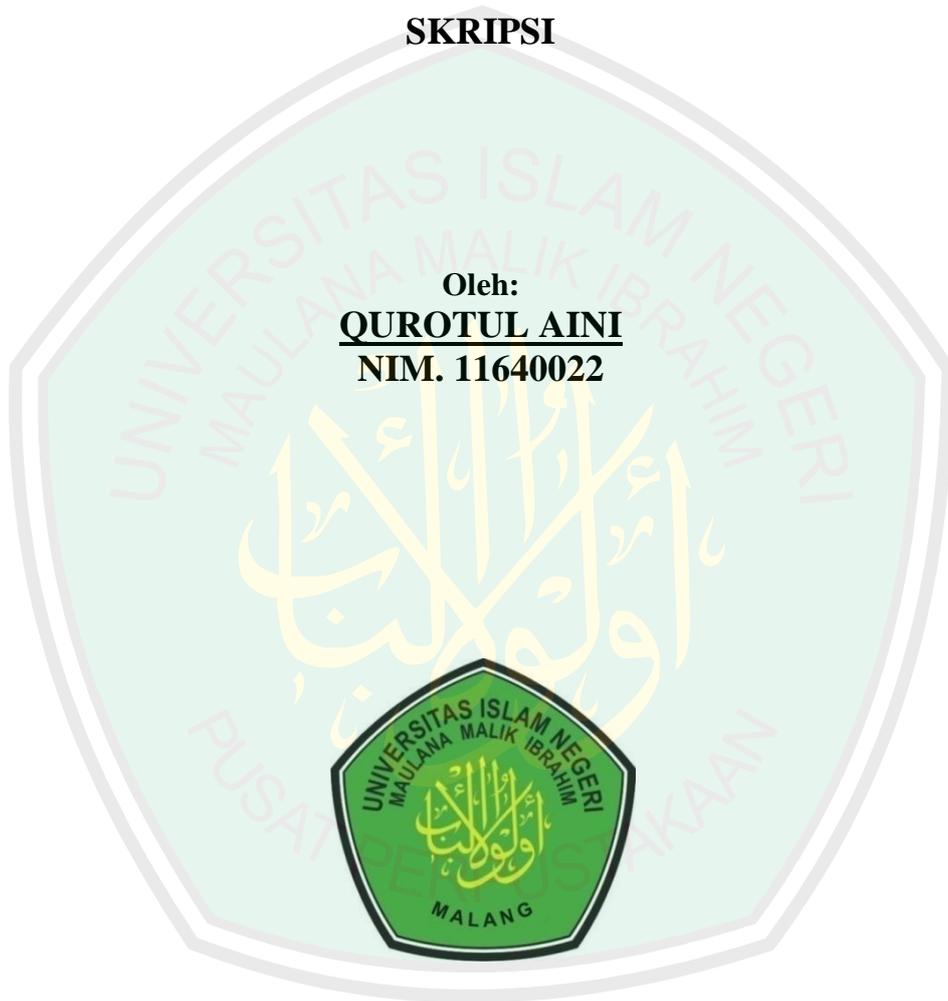
**PENGARUH SUHU DAN WAKTU PEMANASAN TERHADAP
VIABILITAS DAN PROFIL PROTEIN ISOLAT *Staphylococcus
aureus* SEBAGAI BAHAN VAKSIN**

SKRIPSI

Oleh:

QUROTUL AINI

NIM. 11640022



**JURUSAN FISIKA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2015**

**PENGARUH SUHU DAN WAKTU PEMANASAN TERHADAP
VIABILITAS DAN PROFIL PROTEIN ISOLAT *Staphylococcus aureus*
SEBAGAI BAHAN VAKSIN**

SKRIPSI

**Diajukan kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

Oleh:

**OUROTUL AINI
NIM. 11640022**

**JURUSAN FISIKA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2015**

HALAMAN PERSETUJUAN

PENGARUH SUHU DAN WAKTU PEMANASAN TERHADAP VIABILITAS
DAN PROFIL PROTEIN ISOLAT *Staphylococcus aureus* SEBAGAI BAHAN
VAKSIN

SKRIPSI

Oleh:
QUROTUL AINI
NIM. 11640022

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 28 Oktober 2015

Pembimbing I,

Pembimbing II,

dr. Avin Ainur Fitriainingsih
NIP. 19800203 200902 2 002

Umaiatus Syarifah, M.A
NIP. 19820925 200901 2 005

Mengetahui,
Ketua Jurusan Fisika

Erna Hastuti, M.Si
NIP. 19811119 200801 2 009

HALAMAN PENGESAHAN

PENGARUH SUHU DAN WAKTU PEMANASAN TERHADAP VIABILITAS DAN PROFIL PROTEIN ISOLAT *Staphylococcus aureus* SEBAGAI BAHAN VAKSIN

SKRIPSI

Oleh:
OUROTUL AINI
NIM. 11640022

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 9 November 2015

Penguji Utama	:	<u>DR. Agus Mulyono, M.Kes</u> NIP. 19750808 199903 1 003	
Ketua Penguji	:	<u>Erna Hastuti, M.Si</u> NIP. 19811119 200801 2 009	
Sekretaris Penguji	:	<u>dr. Avin Ainur Fitriainingsih</u> NIP. 19800203 200902 2 002	
Anggota Penguji	:	<u>Umaiatus Syarifah, M.A</u> NIP. 19820925 200901 2 005	

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Fisika

Erna Hastuti, M.Si
NIP. 19811119 200801 2 009

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : QUROTUL AINI
NIM : 11640022
Jurusan : FISIKA
Fakultas : SAINS DAN TEKNOLOGI
Judul Penelitian : Pengaruh Suhu dan Waktu Pemanasan Terhadap Viabilitas dan Profil Protein Isolat *Staphylococcus aureus* Sebagai Bahan Vaksin.

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 18 Nopember 2015
Yang Membuat Pernyataan,

Qurotul Aini
NIM. 11640022

MOTTO

“Keberhasilan adalah sebuah proses. Niatmu adalah awal keberhasilan. Peluh keringatmu adalah pendedapnya. Tetesan air matamu adalah pewarnanya. Doamu dan doa orang-orang disekitarmu adalah bara api yang mematangkannya. Kegagalan di setiap langkahmu adalah pengawetnya. Aku tersadar, bersabarlah! Allah selalu menyertai orang-orang yang penuh kesabaran dalam proses menuju keberhasilan. Sesungguhnya kesabaran akan membuatmu mengerti bagaimana cara mensyukuri arti sebuah keberhasilan.”

يَا أَيُّهَا الَّذِينَ ءَامَنُوا اسْتَعِينُوا بِالصَّبْرِ وَالصَّلَاةِ إِنَّ اللَّهَ مَعَ الصَّابِرِينَ ﴿١٥٣﴾

“Hai orang-orang yang beriman, jadikanlah sabar dan shalat sebagai penolongmu, sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar” (Q.S Al Baqarah: 153).

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah.. Alhamdulillah.. Alhamdulillahirobbil'amin..

Sujud syukurku kupersembahkan kepadamu Tuhan yang Maha Agung nan Maha Tinggi. Dengan segala Rahman dan Rahim-Mu, telah Kau jadikan aku manusia yang senantiasa berpikir, berilmu, beriman serta bersabar dalam menjalani kehidupan ini. Semoga keberhasilan ini menjadi satu langkah awal bagiku untuk meraih cita-citaku kelak.

Dengan segala kerendahan hati yang tulus, bersama Ridha-Mu kupersembahkan karya kecil ini untuk:

“Papa Abdul Rokhim dan Mama Surtini tercinta, yang tiada pernah henti selama ini memberiku semangat, doa, dorongan, nasehat dan kasih sayang yang begitu luar biasa, serta pengorbanan yang tak tergantikan hingga aku selalu kuat menjalani rintangan yang ada didepanku. Pa.. Ma.. maafkan anakmu ini yang mungkin masih saja banyak menyusahkanmu dengan tingkah-tingkahku.”

“Kakak-kakakku Isnaini Khusna dan Devi Yusroni, Adikku tercinta Lana Azizir Rahim, serta keluarga besarku (Bani Sholeh, Bani Danun), kalian adalah penyemangat kedua setelah ayah dan Ibuku. Terima kasih atas kasih sayang, kepercayaan, motivasi dan segala bentuk dukungan yang tak terhingga. Semangatku sebab kalian semua.”

“Kepada lentera hidupku dosen-dosen Jurusan Fisika, terutama Ibu Avin Ainur yang tak pernah lelah dan tetap sabar memberiku arahan dan bimbingan. Ibu Umaiyah, semoga anak yang dilahirkan menjadi anak yang sholihah dan berguna bagi bangsa dan agama. semoga Allah selalu melindungi dan meninggikan derajat bapak ibu di dunia dan di akhirat.

“Teruntuk teman-teman Fisika angkatan 2011 terutama kelas A, teman seperjuanganku Evi, teman-teman biofisika, sahabat-sahabatku (nisa'ul, ndug fika, yusro, hanik, mbak bro, lely, linda, aminah, diah, eka, nita), serta orang tersayang (Anang F. Rahman), Terima kasih atas bantuan, motivasi, dan keceriaan kalian. Tiada hari yang indah tanpa kalian semua, terimakasih atas warna-warni indah dalam hidupku”

“Aku belajar, aku tegar, aku bersabar, hingga aku berhasil. Terimakasih untuk semua ^_^”

KATA PENGANTAR



Assalamu'alaikum Wr. Wb

Alhamdulillahirobbil'alamiin, puja dan puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT. Yang telah melimpahkan rahmat, hidayah serta kasih sayang-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Suhu dan Waktu Pemanasan Terhadap Viabilitas dan Profil Protein Isolat *Staphylococcus aureus* Sebagai Bahan Vaksin”** ini. Tidak lupa pula untaian sholawat dan salam penulis panjatkan kepada Rosulullah Muhammad SAW yang telah diutus kebumi sebagai lentera bagi hati manusia, Nabi yang telah menuntun manusia dari zaman yang biadab menuju jaman yang beradab, yang penuh dengan ilmu pengetahuan luar biasa saat ini.

Penulisan skripsi yang telah penulis susun dibuat untuk diajukan kepada Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam memperoleh gelar sarjana sains (S.Si) serta untuk kemajuan ilmu pengetahuan di negeri tercinta, Indonesia.

Dengan ini penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini tidak akan tersusun dengan baik tanpa adanya bantuan dari pihak-pihak yang terkait. Oleh karena itu, pada kesempatan ini tidak lupa juga penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam kegiatan penelitian maupun dalam penyusunan penulisan skripsi.

Ucapan terima kasih yang sebesar-sebesarnya penulis ucapkan kepada:

1. Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang selalu memberikan pengetahuan dan pengalaman yang berharga.
2. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Erna Hastuti, M.Si selaku Ketua Jurusan Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

4. dr. Avin Ainur F selaku dosen pembimbing skripsi yang telah memberikan banyak kesabaran, waktu dan ilmu dalam membimbing penulis agar skripsi ini tersusun dengan baik dan benar.
5. Umaiyatus Syarifah, M.A selaku dosen pembimbing agama, yang bersedia meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan dan pengarahan bidang integrasi Sains dan al-Qur'an serta Hadits.
6. Segenap dosen, laboran, dan admin Jurusan Fisika Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang senantiasa memberikan ilmu pengetahuan dan pengarahan.
7. Kedua orang tua, dan keluarga yang selalu mendoakan serta memberi dukungan yang luar biasa.
8. Teman-teman fisika angkatan 2011 yang banyak selalu menemani dan memberikan banyak motivasi yang berharga.
9. Semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan motivasi dalam penulisan skripsi ini.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis sangat menyadari masih ada banyak kekurangan dan kekeliruan dikarenakan keterbatasan kemampuan. Dengan kerendahan hati, segala kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan untuk kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata, semoga skripsi ini dapat menambah khasanah pustaka dan bermanfaat bagi orang lain.

Malang, 18 Nopember 2015

penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
المخلص	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.4 Manfaat Penelitian	9
1.5 Batasan Masalah	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.1.1 Morfologi	10
2.1.2 Patogenesis	13
2.1.3 Faktor Virulensi	14
2.1.4 Mekanisme Infeksi	18
2.2 Pertumbuhan Bakteri	19
2.3 Vaksin	21
2.4 Vaksin Pemanasan	23
2.4.1 Pemanasan	23
2.4.2 Waktu Kematian Termal dan Waktu Pengurangan Desimal	24
2.5 Protein	25
2.6 Antigen dan antibodi	25
2.7 Elektroforesis	28
2.8 Viabilitas	32
BAB III METODE PENELITIAN	35
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	35
3.2 Jenis Penelitian	35
3.3 Alat dan Bahan Penelitian	35
3.3.1 Alat Penelitian	35
3.3.2 Bahan Penelitian	36
3.4 Devinsi Operasional	36
3.5 Kerangka Konsep	38

3.6	Prosedur Penelitian	39
3.7	Prosedur Kerja	40
3.7.1	Sterilisasi	40
3.7.2	Pembuatan Medium NA (<i>Nutrien Agar</i>)	40
3.7.3	Pembuatan Medium NB (<i>Nutrien Borth</i>)	40
3.7.4	Pelemahan <i>S. aureus</i> dengan Pemanasan	41
3.7.5	Pengujian Viabilitas dengan Teknik Pengenceran	41
3.7.6	Karakterisasi Profil Protein <i>S.aureus</i> Menggunakan SDS-PAGE	42
3.8	Teknik Pengumpulan Data	45
3.9	Analisa Data	46
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		47
4.1	Analisa Prosedur	47
4.1.1	Pewarnaan Gram Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	47
4.1.2	Peremajaan Bakteri <i>S. aureus</i>	50
4.1.3	Pembuatan Sampel Bakteri	51
4.1.4	Perlakuan	53
4.1.5	Penentuan Viabilitas bakteri <i>S. aureus</i>	53
4.1.6	Karakterisasi Protein Menggunakan SDS PAGE	54
4.2	Hasil Penelitian	57
4.2.1	Data Hasil Penelitian	57
4.2.2	Viabilitas Bakteri <i>S.aureus</i>	59
4.2.3	Profil Protein Bakteri <i>S.aureus</i>	62
4.3	Pembahasan	65
4.3.1	Pengaruh Suhu dan Waktu Terhadap Viabilitas Bakteri	65
4.3.2	Pengaruh Suhu dan Waktu Terhadap Profil Protein Bakteri	71
4.3.3	Vaksinasi Sebagai Tindakan Pencegahan Penyakit dalam Islam	72
BAB V PENUTUP		75
5.1	Kesimpulan	75
5.2	Saran	75
DAFTAR PUSTAKA		
LAMPIRAN		

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bentuk Mikroskopis <i>S. aureus</i> pada sempel dahak	10
Gambar 2.2 Alur Karakteristik <i>Staphylococcus</i> secara Biokimia.....	12
Gambar 2.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	20
Gambar 2.4 Mekanisme kerja vaksin.....	22
Gambar 2.5 Penyajian Skematik Situs Reaksi Antigen	26
Gambar 2.6 Struktur Berbagai Kelas Imonoglobulin	27
Gambar 2.7 SDS-PAGE.....	30
Gambar 2.8 Prinsip Kerja SDS-PAGE.....	31
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	38
Gambar 3.2 Prosedur Penelitian	39
Gambar 4.1 Hasil Pengujian Bakteri <i>S. aureus</i> dengan perbesaran 40x	49
Gambar 4.2 Koloni Bakteri <i>S. aureus</i> Pada Medium NA Padat	54
Gambar 4.3 Grafik Hubungan Antara Persentase Viabilitas dengan Suhu dan Waktu	60
Gambar 4.4 Profil Protein Bakteri <i>S. aureus</i> Hasil Pemanasan dengan Variasi Suhu dan Waktu (Elektroforesis SDS-PAGE)	62

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Ciri-ciri Biologis Beberapa Kelas Imonoglobulin	27
Tabel 3.1 Data Hasil Uji Viabilitas	46
Tabel 4.1 Data Hasil Rata-Rata Uji Viabilitas Bakteri <i>S. aureus</i> Setelah Diberi Pengaruh Suhu dan Waktu	58
Tabel 4.2 Data Persentase Viabilitas Bakteri <i>S. aureus</i> Setelah Diberi Pengaruh Suhu dan Waktu	59
Tabel 4.3 Ekspresi Pita Protein Hasil Pemanasan dengan Variasi Suhu dan Waktu	63
Tabel 4.4 Ekspresi Pita Protein (Tebal dan Tipis) Hasil SDS PAGE	64



DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Data Hasil Penelitian
- Lampiran 2 Hasil Pengujian SPSS
- Lampiran 3 Perhitungan Berat Molekul
- Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian



ABSTRAK

Aini, Qurotul. 2015. **Pengaruh Suhu dan Waktu Pemanasan Terhadap Viabilitas dan Profil Protein Isolat *Staphylococcus aureus* Sebagai Bahan Vaksin.** Skripsi. Jurusan Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: (I) dr. Avin Ainur Fitriyaningsih (II) Umayyatus Syarifah, M.A

Kata kunci: *Staphylococcus aureus*, Temperatur, Viabilitas, Protein, Elektroforesis SDS-PAGE

Infeksi merupakan salah satu penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme. *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu mikroorganisme gram positif yang dapat menyebabkan penyakit infeksi, bahkan kematian. Pencegahan yang paling umum untuk penyakit infeksi adalah dengan antibiotik. Akan tetapi penggunaan antibiotik masih dirasa kurang efektif karena dapat menyebabkan resistensi bakteri, residu dan biaya yang cukup mahal. Alternatifnya adalah vaksinasi. Salah satu metode yang digunakan dalam pembuatan vaksin bakteri adalah pemanasan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh suhu dan waktu terhadap viabilitas dan profil protein bakteri *Staphylococcus aureus*, sehingga diharapkan terdapat protein yang memiliki berat molekul yang dapat digunakan sebagai bahan vaksin. Pengujian viabilitas dilakukan dengan menggunakan teknik pengenceran, dan untuk profil protein dilakukan dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE. Bakteri *Staphylococcus aureus* diinkubasi pada suhu 40 °C, 45 °C, dan 50 °C selama 10 menit, 20 menit, dan 30 menit. Hasil viabilitas menunjukkan bahwa ada pengaruh yang signifikan ($p < 0.05$) antara suhu dan lamanya pemanasan terhadap viabilitas bakteri *Staphylococcus aureus* dimana terjadi penurunan viabilitas bakteri seiring dengan bertambahnya suhu dan lama pemanasan. Hasil SDS PAGE mengungkapkan terjadi kenaikan serta penurunan ekspresi protein pada setiap perlakuan dilihat dari tebal dan tipisnya densitas protein yang terekspresi. Berat molekul protein yang diperoleh semuanya lebih dari 10 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa protein hasil pemanasan pada setiap perlakuan dapat digunakan sebagai bahan vaksin.

ABSTRACT

Aini, Qurotul. 2015. **The Effect of Temperature and Heating Time toward Viability and Profile Protein Isolate of *Staphylococcus aureus* as Vaccine Substance**. Essay. Physics Department, Faculty of Science and Technology State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisors: (I) dr. Avin Ainur Fitrianingsih (II) Umayatus Syarifah, M.A.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Temperature, Viability, Protein, Electrophoresis SDS-PAGE

Infection is one of the diseases caused by microorganisms. *Staphylococcus aureus* is a gram-positive microorganisms that can cause infection, and even death. The most common prevention of infection is by using antibiotics. But, the use of antibiotics is still not effective because it cause bacterial resistance, residues and expensive cost. The alternative one is vaccination. One of methods used in making bacteria vaccine is heating. The aimed of this study is to know the effect of temperature and time toward viability and profile protein isolate of *Staphylococcus aureus*, so it expected that there was a protein which has molecule weight to use as vaccine substance. The viability testing was done by using dilution techniques, and for profile protein done by using electrophoresis SDS-PAGE. *Staphylococcus aureus* bacteria were incubated at 40 °C, 45 °C, and 50 °C for 10 minutes, 20 minutes and 30 minutes. The results of viability indicated that there is a significant effect ($p < 0.05$) between the temperature and duration toward viability of *Staphylococcus aureus* in which bacteria viability was decrease since the temperature and heating duration were increased. SDS PAGE results revealed an increase and a decrease in the expression of proteins in each treatment seen from the thick and thin density expressed protein. The molecule protein weight obtained is more than 10 kDa. This indicates that the protein heating results in each treatment can be used as vaccine substance.

مستخلص البحث

قرة العين، 2015م، تأثير درجة الحرارة ووقت التدفئة على جدوى وملف عزلات البروتين (ستفي لوجوجوس اوروس) مادة البروتين. البحث الجامعي. قسم فيزياء. كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية بمالانج. المشرفة الأولى: الدكتورة الف عينور فتريانغسيه الماجستير، والمشرفة الثانية: عمية الشريفة الماجستير.

الكلمات الأساسية: (ستفي لوجوجوس اوروس)، درجة الحرارة، البروتين، الكترولفوروسيس SDS-PAGE

ان عدويا هو احد من مرض الذي يسبب كائنات الحية الدقيقة. واما (ستفي لوجوجوس اوروس) هو احد من كائنات الحية الدقيقة من جرام ايجابي والتي تمكن ان تسبب عدويا حتى الموت. واما الوقاية المستخدمة لمنع من هذا المرض وهي باستخدام مضادات الحيوية ولكن في استخدامها هذه الوقاية لا يزال أقل فعالية لان تسبب هذه الوقاية مقاومة البكتيرية، بقايا واجرة غالية واما بدلا من ذلك وهو باستخدام تلقيحا. واما الطريقة المستخدمة في صناعة اللقاحات البكتيرية وهي بالتدفئة. واما الأهداف المرجوة في هذا البحث وهي لمعرفة تأثير درجة الحرارة ووقت التدفئة على جدوى وملف عزلات البروتين (ستفي لوجوجوس اوروس) حتي نرجو هنا بروتين البكتيري الذي لديه الوزن الجزئي ونستطيع ان نستخدم منها لتلقيح. والأسلوب المستخدمة لإختبار جدوى في هذا البحث وهي اسلوب التخفيف باستخدام الكترولفوروسيس SDS-PAGE. واما تخضين للبكتيري (ستفي لوجوجوس اوروس) على درجة الحرارة 40°C ، 45°C و 50°C لمدة خمس دقائق وثلاثون دقيقة. واما النتائج في هذا البحث تدل على أن تأثير في هذا البحث هو ذو معنى (signifikan) حوالي ($p < 0,05$) بين درجة الحرارة ومدة التدفئة على جدور من للبكتيري (ستفي لوجوجوس اوروس) حيث تراجع الجدوي البكتيرية مع زيادة درجة الحرارة ووقت التدفئة. واما النتائج من SDS-PAGE تعتبر هناك زيادة وانخفاض في تعبير البروتين في كل الإجراءات وبالنظر من كثافة ترقيق وسميك البروتين السراء والضراء. واما الوزن من مركبات البروتين حصلت كلية أكثر من 10 kDa . وهذا الحال يدل على ان البروتين من نتيجة التدفئة في كل اجراءات نستطيع ان نستخدم منها لتلقيح.

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Manusia secara konstan berhubungan dengan beribu-ribu mikroorganisme. Tempat hidupnya tidak hanya terdapat di lingkungan tetapi juga menghuni tubuh manusia. Mikroba yang secara alamiah menghuni tubuh manusia disebut flora normal. Kebanyakan mikroba asli didalam tubuh manusia adalah komensial, mereka hidup berdampingan dan memanfaatkan hubungannya dengan inang, tetapi inangnya tidak berpengaruh. Bakteri merupakan salah satu mikroba yang hidup secara flora normal pada manusia. Akan tetapi sekarang ini, dengan kondisi lingkungan yang semakin hari bertambah kumuh atau kurang kondusif karena pertumbuhan populasi yang pesat, maka bakteri yang tadinya hidup secara flora normal, akan tumbuh dengan cepat ketika daya tahan tubuh dari inang itu lemah, atau biasa disebut dengan infeksi.

Penyakit infeksi masih menempati urutan teratas penyebab penyakit dan kematian, khususnya di negara-negara berkembang termasuk Indonesia, sebagai akibatnya akan terjadi penderitaan fisik dan penurunan produktifitas kerja. Infeksi adalah invasi dan berkembang biaknya mikroorganisme patogen (bakteri, parasit, fungi, virus, prion, atau viroid) pada bagian tubuh dan jaringan yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Infeksi dapat terjadi karena 3 faktor, yaitu mikroorganisme itu sendiri, faktor lingkungan serta kondisi dari inang (manusia atau hewan). Menurut Wahyono (2010), terjadinya infeksi pada seseorang

dipengaruhi oleh banyaknya mikroorganisme penyebab yang masuk dalam tubuh, derajat virulensi serta kekebalan tubuh.

Di dalam al-qur'an secara tersirat Allah SWT telah menjelaskan tentang keberadaan mikroorganisme dan bakteri. Firman Allah dalam surat an-nahl (16):
13:

وَمَا ذَرَأَ لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ ﴿١٣﴾

“Dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lainan macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran”(Q.S an-nahl: 13).

Kalimat (وَمَا ذَرَأَ لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ) mengandung arti *“Dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini, yakni hewan, tumbuh-tumbuhan dan sebagainya dengan berlain-lainan macamnya”* (Jalaluddin, 2010). Dari sini tersirat bahwa Allah SWT telah menciptakan makhluk yang beraneka ragam mulai dari yang dapat terlihat oleh mata langsung maupun makhluk yang tidak dapat dilihat oleh mata secara langsung, seperti bakteri. Bakteri merupakan jasad renik yang berukuran sangat kecil dan untuk melihatnya harus menggunakan mikroskop. Salah satu jenis bakteri yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia atau hewan adalah bakteri *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus merupakan spesies bakteri dari genus *Staphylococcus* yang berbentuk bulat atau bola, tersusun bergerombol menyerupai buah anggur dan menghasilkan pigmen yang berwarna kuning emas. Bakteri ini bersifat gram-positif dan dapat tumbuh dengan atau tanpa bantuan oksigen.

Koloni yang masih sangat muda tidak berwarna. Pembentukan pigmen paling baik apabila koloni tersebut tumbuh pada medium Nutrien Agar (NA) miring. *Staphylococcus aureus* juga merupakan bakteri patogen pada kulit.

Staphylococcus aureus dapat ditemukan pada permukaan kulit sebagai flora normal, terutama disekitar hidung, mulut, alat kelamin, dan sekitar anus. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan infeksi pada luka, biasanya berupa abses yang merupakan kumpulan nanah atau cairan dalam jaringan yang disebabkan oleh infeksi. Infeksinya dapat menular selama ada nanah yang keluar dari lesi atau hidung. Selain itu jari jemari juga dapat membawa infeksi *Staphylococcus aureus* dari satu bagian tubuh yang luka atau robek (Dowshen, *et al.*, 2002).

Infeksi yang lebih serius, pneumonia, mastitis, flebitis, meningitis dan infeksi pada saluran urine. Selain itu, *Staphylococcus aureus* juga menyebabkan infeksi kronis, seperti osteomielitis dan endokarditis. *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu penyebab utama infeksi nosokomial akibat luka operasi dan pemakaian alat perlengkapan perawatan rumah sakit. *Staphylococcus aureus* juga dapat menyebabkan keracunan makanan akibat enterotoksin yang dihasilkannya dan menyebabkan sindrom syok toksik (Toxic Shock Syndrome) akibat pelepasan seperantigen ke dalam aliran darah (Dudy Disyadi, 2009).

Upaya mengurangi resiko infeksi oleh bakteri *Staphylococcus aureus* adalah mengembalikan fungsi dari organ atau jaringan yang terinfeksi dengan memberikan obat yang mengandung antibiotik. Sesuai dengan sabda Nabi SAW :

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

“Tidaklah Allah menurunkan penyakit kecuali Dia turunkan untuk penyakit itu obatnya” (HR. Bukhori).

Hadist tersebut jelas menerangkan bahwa Allah tidak akan menurunkan penyakit kecuali dengan obatnya, dan antibiotik merupakan obat yang tepat digunakan untuk penyakit infeksi oleh bakteri. Akan tetapi penggunaan antibiotik sekarang ini sering menyebabkan terjadinya resistansi bakteri terhadap zat antibiotik, sehingga dapat menimbulkan strain baru dari bakteri yang telah kebal terhadap antibiotik. Seperti MRSA (*Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*) yang merupakan galur *S. aureus* yang telah resisten terhadap antibiotik metisilin. Sebagai alternatifnya, vaksinasi merupakan salah satu upaya pencegahan terhadap resistensi bakteri dan residu antibakteri (Soeripto, 2002).

Vaksin merupakan suatu suspensi mikroorganisme yang telah dimodifikasi dengan cara dimatikan atau dilemahkan sehingga tidak menimbulkan penyakit dan dapat merangsang pembentukan kekebalan atau antibodi aktif (Tetrianan dan Sugoro, 2007). Untuk menimbulkan penyakit, organisme patogen harus berkembang biak dan aktif secara metabolik. Penjelasan mengenai respon kekebalan disebut imunitas. Imunitas dibagi menjadi dua, yaitu imunitas humoral dan dapatan. Imunitas dapatan didapat dari pemberian vaksin (Pelczar, 2012).

Perbedaan pendapat mengenai vaksin dan imunitas beberapa tahun terakhir ini telah ramai diperbincangkan. Bagi orang-orang kontra dengan vaksin, banyak dalil yang dikeluarkan sebagai referensi penguatan atas pendapatnya. Diantara pendapatnya adalah: (1) Vaksin haram karena menggunakan media ginjal kera, babi, aborsi bayi, darah orang yang tertular penyakit infeksi yang notabene

pengguna alkohol, obat bius, dan lain-lain. Ini semua haram dipakai secara syari'at. (2) Efek samping yang membahayakan karena mengandung merkuri, thimerosal dan zat-zat berbahaya lain yang akan memicu autisme, cacat otak, dan lain-lain. (3) Adanya campur tangan negara barat (konspirasi) dalam menghancurkan negara berkembang dan negara muslim. (4) Adanya beberapa laporan yang menyatakan bahwa anak mereka yang tidak diimunisasi/divaksin masih tetap sehat, dan lebih baik dari pada yang diimunisasi/divaksin, dan masih banyak lagi pendapat-pendapat lainnya yang menolak dengan adanya vaksinasi (Bahraen, 2011).

Sedangkan menurut pendapat orang-orang yang pro (mendukung) tentang vaksinasi dijelaskan bahwa hal tersebut diperbolehkan (mubah). Syaikh Abdul Aziz bin Baz (mufti besar kerajaan Arab Saudi, ketua Lajnah Daimah dan mantan rektor Universitas Islam Madinah) menjelaskan bahwa tidak masalah (*La ba'sa*) berobat dengan cara vaksinasi/imunisasi jika dikhawatirkan tertimpa penyakit karena adanya wabah atau sebab-sebab lain. Dan diperbolehkan menggunakan obat untuk menolak atau menghindari wabah yang dikhawatirkan. Hal ini berdasarkan sabda Nabi SAW dalam hadits shahih (yang artinya), “ *Barang siapa makan tujuh butir kurma Madinah pada pagi hari, ia tidak akan terkena pengaruh buruk sihir atau racun*”. Hal ini termasuk tindakan menghindari penyakit sebelum terjadi. Demikian juga vaksinasi/imunisasi yang dilakukan sebagai tindakan pencegahan terhadap suatu penyakit atau wabah yang berbahaya (Bahraen, 2012).

Syaikh Muhammad Shalih Al-Munajjid (imam masjid dan khatib di Masjid Umar bin Abdul Aziz dan dosen ilmu-ilmu keagamaan) mengemukakan fatwa

bahwa vaksin yang terdapat didalamnya bahan yang haram atau najis pada asalnya, ketika dalam proses kimia atau ketika ditambahkan bahan lain yang mengubah nama dan sifatnya akan menjadi bahan mubah, proses ini dinamakan “istihalah” (Bahraen, 2012).

Menurut MUI (Majelis Ulama Indonesia) selama ini baru mengeluarkan 3 fatwa tentang vaksin, yaitu OVP (Oral Polio Vaccine), IVP (Inactivated Poliovirus Vaccine), dan meningitis. Fatwa terbaru MUI no. 06 tahun 2010 tentang: Penggunaan vaksin meningitis bagi jemaah haji atau umrah dengan menetapkan ketentuan hukum: (1) Vaksin MencevaxTM ACW135Y hukumnya haram (2) Vaksin Menveo meningococal dan vaksin meningococcal hukumnya halal (3) Vaksin yang boleh digunakan hanya vaksin yang halal (4) Ketentuan dalam fatwa MUI nomor 5 tahun 2009 yang menyatakan bahwa bagi orang yang melaksanakan wajib haji atau umrah wajib, boleh menggunakan vaksin meningitis haram karena kebutuhan mendesak (Bahraen, 2012). Hal ini menjelaskan bahwa tidak semua vaksin mengandung bahan yang haram. Dan masih banyak lagi fatwa yang membolehkan penggunaan vaksin.

Keterangan yang dapat diambil dari Fatwa-fatwa diatas adalah vaksinasi/ imunisasi diperbolehkan (mubah) karena sebagai tindakan pencegahan terhadap suatu wabah atau penyakit, bahan-bahan haram dan najis yang digunakan telah lebur dengan bahan suci lain yang banyak sehingga dapat merubah nama dan sifatnya sehingga mubah digunakan, belum ditemukan pengganti lainnya yang mubah, hal ini termasuk kondisi yang darurat, serta sesuai dengan kemudahan

syari'at islam saat ada kesulitan (Bahraen, 2012). Dan sampai saat ini, vaksin halal masih terus diteliti dan dikembangkan.

Vaksin dapat diproduksi dengan tiga cara, yaitu kimia, pemanasan, serta iradiasi. Prinsip penting dalam pembuatan vaksin adalah metode dalam inaktivasi atau pelemahan harus dapat memusnahkan (seluruh/sebagian) inefektivitas dari organisme, tetapi sifat antigeniknya harus tidak berubah. Vaksin konvensional yang umum digunakan adalah dengan menginaktivasi sel bakteri melalui pemanasan (Rahmawati, 2009).

Penggunaan suhu tinggi serta kelembaban tinggi merupakan salah satu metode yang paling efektif untuk melemahkan ataupun mematikan mikroorganisme, karena telah disebutkan bahwa sel vegetatif bakteri jauh lebih peka terhadap pemanasan. Panas lembab dapat melemahkan atau mematikan bakteri dengan cara mengkoagulasikan protein-proteinnnya (Pelczar, 2012). Pelemahan bakteri melibatkan juga pada perubahan konformasi protein. Protein merupakan suatu enzim yang berfungsi sebagai katalisator. Beberapa jenis protein sangat peka terhadap perubahan lingkungannya. Aktivitas protein banyak bergantung pada struktur dan konformasi molekul protein yang tepat. Apabila konformasi molekul protein berubah contohnya adalah perubahan suhu maka aktivitas biokimianya akan berkurang dan dapat menyebabkan pelemahan bakteri ataupun kematian bakteri (Rahmawati, 2009).

Penelitian ini didasarkan dalam pengembangan vaksin aktif dengan cara melemahkan sel bakteri secara konvensional yaitu dengan pemanasan. Pada penelitian sebelumnya, oleh Hemavathy (2013) yang berjudul "Temperature-

regulated expression of outer membran protein in *Shigella flexneri*” didapatkan kesimpulan bahwa terjadi peningkatan tingkat ekspresi protein pada ukuran molekul tertentu seiring dengan meningkatnya suhu, suhu yang digunakan dalam pelemahannya adalah 37 °C, 38.5 °C, dan 40 °C yang diinkubasi selama 24 jam”. Dan penelitian ini diharapkan juga dapat meningkatkan produksi protein yang berguna dalam pembuatan vaksin. Namun untuk mendukung hal tersebut, maka perlu dilakukan analisis profil protein sesudah pemanasan. Analisis tersebut dapat dilakukan melalui elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polycrylamide Gel Elektrophoresis*), sehingga bakteri tersebut mengalami ekspresi protein yang bagus atau tidak setelah perlakuan.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian diatas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan adalah :

1. Berapa suhu dan waktu yang baik sehingga dapat digunakan untuk melemahkan isolat *Staphylococcus aureus* ?
2. Bagaimana pengaruh suhu dan lama pemanasan terhadap viabilitas isolat *Staphylococcus aureus* ?
3. Bagaimana pengaruh suhu dan lama pemanasan terhadap profil protein isolat *Staphylococcus aureus* yang dapat digunakan sebagai bahan vaksin ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui suhu dan waktu yang baik sehingga dapat digunakan untuk melemahkan isolat *Staphylococcus aureus*.

2. Mengetahui pengaruh suhu dan lama pemanasan terhadap viabilitas isolat *Staphylococcus aureus*.
3. Mengetahui pengaruh suhu dan lama pemanasan terhadap profil protein isolat *Staphylococcus aureus* yang dapat digunakan sebagai bahan vaksin.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat Teoritis : Menambah khasanah keilmuan tentang mikrobiologi mengenai kecenderungan profil protein dan viabilitas isolat *Staphylococcus aureus* hasil pemanasan dengan variasi suhu dan waktu sebagai bahan vaksin.

Manfaat Praktis : Penelitian ini dapat menjadi solusi untuk menyelesaikan problem berbagai penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* serta dapat berperan aktif dalam pengembangan vaksin yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.5 Batasan Masalah

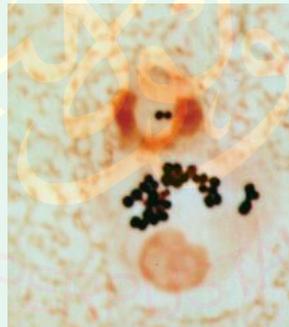
1. Penelitian ini menggunakan isolat murni bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Pelemahan isolat *Staphylococcus aureus* menggunakan pemanasan dengan variasi suhu 40, 45, dan 50 °C dan variasi waktu 10, 20, dan 30 menit.
3. Analisa profil protein menggunakan elektroforesis SDS-PAGE.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Morfologi

Staphylococcus aureus adalah bakteri yang berasal dari kata “*Staphele*” dalam bahasa Yunani yang berarti anggur dan kata “*aureus*” dalam bahasa latin yang berarti emas. Nama tersebut diberikan berdasarkan bentuk sel-sel bakteri jika dilihat dibawah mikroskop dan warna keemasan yang terbentuk jika bakteri ditumbuhkan pada suatu media. Bakteri ini pertama kali diamati dan dibiakkan oleh Pasteur dan Koch, kemudian diteliti secara lebih terperinci oleh Ogston dan Rosenbach pada era tahun 1880-an (Lowy, 2014).



Gambar 2.1 Bentuk Mikroskopis *S. aureus* dalam sampel dahak (Lowy, 2014).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan bakteri gram positif yang berbentuk bulat dengan diameter 0.7 – 1.2 μm , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. *S. aureus* dapat tumbuh pada suhu 15-45 $^{\circ}\text{C}$ dan dalam NaCl berkonsentrasi 15 %. Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37 $^{\circ}\text{C}$, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar 20 – 25 $^{\circ}\text{C}$. *S. aureus*

mengandung polisakarida dan protein yang berfungsi sebagai antigen dan merupakan substansi penting didalam struktur dinding sel, tidak membentuk spora, dan tidak membentuk flagel (Jewetz *et al.*,2008).

S. aureus tumbuh pada media cair dan padat seperti NA (*Nutrien Agar*) dan BAP (*Blood Agar Plate*) dan dengan aktif melakukan metabolisme, mampu fermentasi karbohidrat dan menghasilkan bermacam-macam pigmen dari putih hingga kuning. Pada pembedihan cair menyebabkan kekeruhan yang merata tidak membentuk pigmen (Dowshen *et al.*, 2002).

Klasifikasi

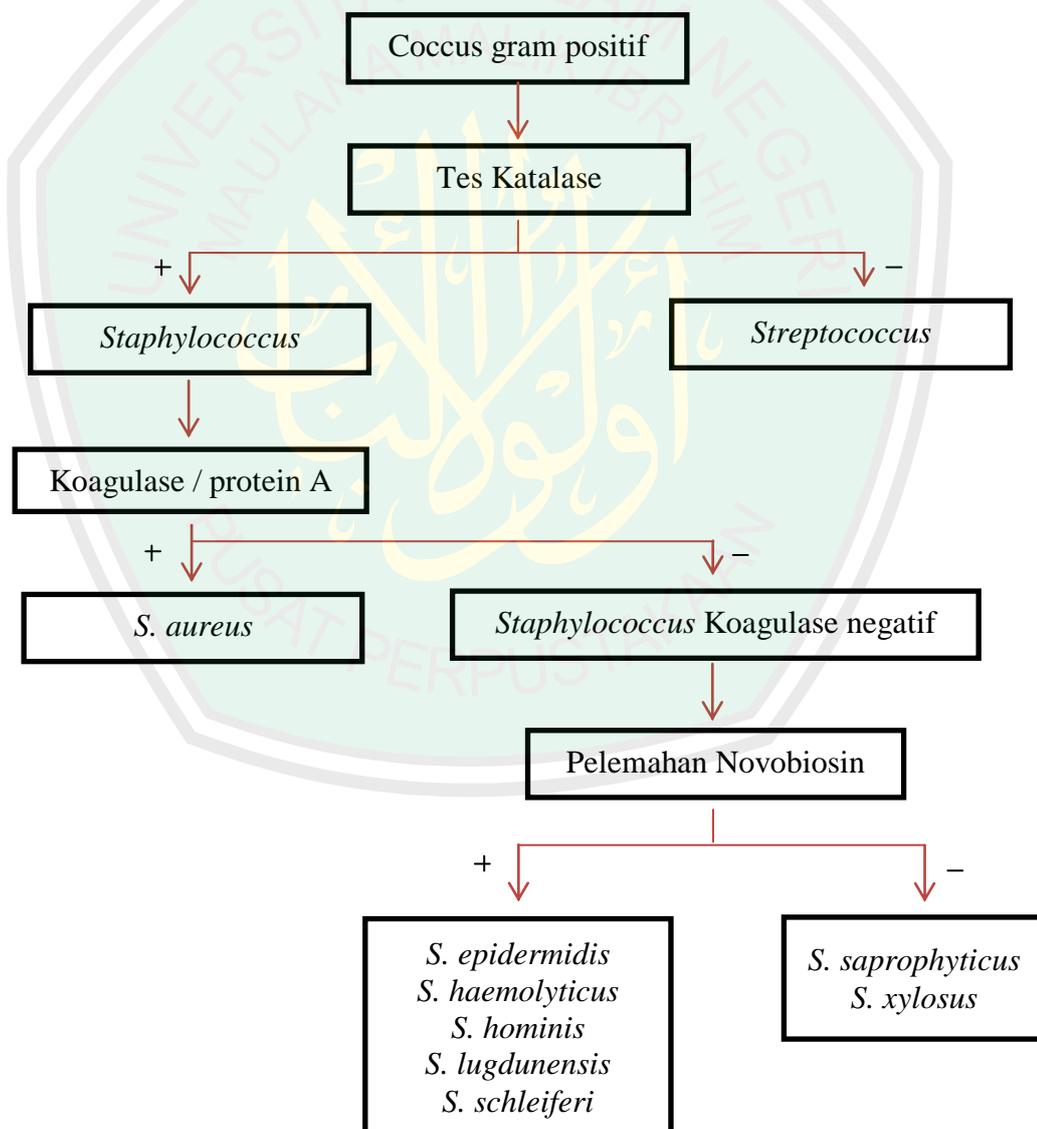
Dari Rosenbach klasifikasi *Staphylococcus aureus* yaitu (Lowy, 2014):

Domain	: <i>Bacteria</i>
Kerajaan	: <i>Eubacteria</i>
Filum	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Bacillales</i>
Famili	: <i>Staphylococcusceae</i>
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>S. aureus</i>

Nama binomial : *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus merupakan coccus gram positif dalam keluarga *Staphylococcusceae*, membentuk kelompok seperti anggur pada noda Gram (Gambar 2.1). Mereka mampu bertahan hidup lama di lingkungan permukaan dalam kondisi yang berbeda-beda. Sebuah strategi sederhana untuk

mengidentifikasi spesies penting lain yang lebih klinis dapat diuraikan dalam Gambar 2.2 . Sistem diagnostik otomatis, kotak-kotak untuk karakterisasi secara biokimia, dan tes berbasis DNA tersedia untuk membedakan antar species. Dengan beberapa pengecualian, *S. aureus* dibedakan dari spesies *Staphylococcus* lainnya dengan melihat dari produksi koagulasenya, enzim permukaan yang mengubah fibrinogen menjadi fibrin (Lowy, 2014).



Gambar 2.2 Alur Karakteristik *Staphylococcus* secara Biokimia (Lowy, 2014).

2.1.2 Patogenesis

Sebagian bakteri *Staphylococcus* merupakan flora normal pada kulit, saluran pernafasan, dan saluran pencernaan makanan pada manusia. Bakteri ini juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar. Infeksi oleh *S. aureus* dapat menyebabkan penyakit karena kemampuan berkembang biak dan menyebar luas dalam jaringan tubuh serta adanya beberapa zat ekstraseluler yang diproduksi. Beberapa zat ini adalah enzim, sedangkan yang lain diduga toksin. Meskipun berfungsi sebagai enzim kebanyakan toksin berada dibawah pengendalian genetik plasmid atau DNA yang berbentuk sirkuler dan terdapat didalam kromosom (Jewetz *et al.*,2008).

Rosenbach juga mengungkapkan bahwa *S. aureus* merupakan penyebab infeksi pada luka dan furunkel. Ciri khas infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* adalah radang supuratif (bernanah) pada jaringan lokal dan cenderung menjadi abses. Infeksi superfisial ini dapat menyebar ke jaringan yang lebih dalam menimbulkan osteomielitis, artritis, endokarditis, dan abses pada otak, paru-paru, ginjal serta kelenjar *mammae*. Patogenesis infeksi bakteri *S. aureus* merupakan hasil interaksi berbagai protein permukaan bakteri dengan berbagai reseptor pada permukaan sel inang. Penentuan faktor virulen mana yang paling berperan sulit dilakukan karena demikian banyak dan beragam faktor virulen yang dimiliki *S. aureus* (DeLeo *et al.*, 2009).

Bisul atau abses setempat, seperti jerawat dan borok merupakan infeksi kulit didaerah folikel rambut, kelenjar sebacea, atau kelenjar keringat. Mula-mula terjadi nekrosis jaringan setempat, lalu terjadi koagulasi fibrin disekitar lesi dan

pembuluh getah bening, sehingga terbentuk dinding yang membatasi proses nekrosis. Infeksi dapat menyebar ke bagian tubuh lain melalui pembuluh getah bening dan pembuluh darah, sehingga terjadi peradangan pada vena, trombosis bahkan bakterimia. Bakterimia dapat menyebabkan terjadinya endokarditis, osteomielitis akut hematogen, meningitis atau infeksi paru-paru (Jewetz *et al.*, 2008).

2.1.3 Faktor Virulensi

Kemampuan suatu mikroorganisme patogenik untuk menyebabkan infeksi tidak hanya dipengaruhi oleh sifat mikroba itu sendiri, tetapi juga kemampuan inang dalam menahan infeksi atau membentuk kekebalan. Kemampuan suatu mikroba dalam menyebabkan infeksi disebut virulensi, sedangkan komponen-komponen yang dimiliki oleh suatu mikroba yang dapat meningkatkan patogenesitas disebut faktor virulensi (Pelchzar, 2012).

S. aureus membuat tiga macam metabolit, yaitu yang bersifat nontoksin, eksotoksin, dan enterotoksin. Menurut Prescott LM *et al.*, (2002) *S. aureus* memiliki kemampuan menggunakan sinyal oligopeptida untuk memproduksi toksin dan faktor virulensi. Berbagai zat yang berperan sebagai faktor virulensi dapat berupa protein, termasuk enzim dan toksin, contohnya:

1. Katalase

Katalase adalah enzim yang berperan pada daya tahan bakteri terhadap proses fagositosis. Tes adanya aktivitas katalase menjadi pembeda genus *Staphylococcus* dari *Streptococcus*. Adanya enzim ini dapat diketahui jika koloni dituang H_2O_2 3% akan timbul gelembung-gelembung udara, yang berarti

menghasilkan katalase yaitu mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Arif *et al.*, 2000).

2. Koagulase

S. aureus menghasilkan koagulase suatu protein mirip enzim yang dapat menggumpalkan plasma oksalat atau plasma sitrat, karena adanya faktor koagulase reaktif dalam serum yang bereaksi dengan enzim tersebut. Faktor serum bereaksi dengan koagulase untuk menghasilkan esterase dan menyebabkan aktifitas pembekuan. Esterase yang dihasilkan dapat meningkatkan aktivitas penggumpalan, sehingga terbentuk deposit fibrin pada permukaan sel bakteri yang dapat menghambat fagositosis. Bakteri yang membentuk koagulase dianggap menjadi patogen invasif (Jewetz *et al.*, 2008).

3. Protein A

Letak protein A terdapat pada dinding sel *S. aureus* dan dapat mengganggu sistem imun inang dengan mengikat setengah Fe dari immunoglobulin G (Ig G) 1 dan 2 menghalangi opsonisasi dari mediasi antibodi. Protein A juga berfungsi untuk menghambat fagositosis (Prescott LM *et al.*, 2002).

4. Eksotoksin

Eksotoksin adalah protein. Toksisitasnya akan hilang bila dipanaskan atau diberi perlakuan dengan zat kimia. Toksin yang telah diberi perlakuan dan dimodifikasi sehingga toksisitasnya lenyap disebut toksoid. Toksin dan toksoid mempunyai kemampuan untuk merangsang pembentukan antitoksin, yaitu substansi yang menetralkan toksisitas toksin di dalam tubuh inang. Kemampuan

ini penting untuk melindungi tubuh inang yang rentan terhadap penyakit-penyakit yang disebabkan oleh toksin bakteri (Pelchzar, 2012).

Bahan ini juga ditemukan dalam filtrat hasil pemisahan kuman dengan jalan menyaring kultur. Bahan ini bersifat tidak tahan pemanasan dan bila disuntikkan pada hewan coba dapat menimbulkan kematian dan nekrosis kulit. α -toksin, β -toksin, γ -toksin dan δ -toksin menyerang membran sel mamalia. α -toksin, β -toksin, dan δ -toksin dapat menyebabkan hemolisis. δ -toksin juga menyebabkan leukolisis sel inang. Sedangkan γ -toksin menyebabkan terbunuhnya sel inang (Madigan *et al.*, 2008).

- a. Alfa hemolisa: suatu protein dengan berat molekul 3×10^4 yang dapat melarutkan eritrosit kelinci, merusak trombosit dan dapat mempengaruhi otot polos pembuluh darah.
- b. Beta hemolisa: suatu protein yang dapat menghancurkan eritrosit kambing tetapi tidak pada eritrosit kelinci dalam 1 jam pada suhu 37°C .
- c. Gama hemolisa: bersifat antigen

5. Enterotoksin

Enterotoksin adalah suatu protein dengan berat molekul 3×10^4 yang tahan terhadap pendidihan selama 30 menit (Arif *et al.*, 2000). Enterotoksin merupakan enzim yang tahan panas dan tahan terhadap suasana basa didalam usus. Enzim ini merupakan penyebab utama dalam keracunan makanan, terutama pada makanan yang mengandung karbohidrat dan protein (Jewetz *et al.*, 2008).

Masa tunas antara 2-6 jam dengan gejala yang timbul secara mendadak yaitu: mual, muntah, diare, ataupun dapat juga terjadi kolaps sehingga mungkin

dikira kolera. Efek muntah enterotoksin mungkin akibat perangsangan SSP (Sistem Saraf Pusat). Setelah toksin bekerja pada reseptor-reseptor syaraf dalam usus. *S. aureus* yang membentuk enterotoksin adalah koagulase positif, tetapi tidak semua jenis koagulase positif dapat membentuk enterotoksin. Jika dari setiap gram makanan yang disangka dapat ditemukan ratusan, ribuan kuman *S. aureus* atau lebih, maka hal ini merupakan suatu bukti dugaan bahwa makanan tersebut menyebabkan keracunan makanan. Namun dapat diingat bahwa enterotoksin bersifat termotabil, sehingga makanan yang disangka terdapat bakteri dipanaskan kemungkinan tidak dapat ditemukan kuman lagi, meskipun didalamnya terkandung jumlah besar enterotoksin (Arif *et al.*, 2000).

6. Leukocidin

Toksin ini dapat mematikan sel darah putih pada beberapa hewan yang terkena infeksi. Leukocidin juga merupakan suatu antigen tetapi lebih termolabil dari pada eksotoksin. Tetapi perannya dalam patogenesis pada manusia tidak jelas, karena *Staphylococcus* patogen tidak dapat mematikan sel-sel darah putih manusia dan dapat difagositosis (Jewetz *et al.*, 2008).

7. Eksfoliatif

Toksin ini mempunyai aktivitas proteolitik dan dapat melarutkan matriks mukopolisakarida epidermis, sehingga menyebabkan pemisahan intraepitelial pada ikatan sel di stratum granulosum. Toksin eksofoliatif merupakan penyebab *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*, yang ditandai dengan melepuhnya kulit.

Bakteri yang resisten dapat mengancam kehidupan manusia atau hewan karena dapat meningkatkan morbiditas penyakit dan mortalitas akibat kegagalan

pengobatan. Selain itu, biaya pengobatan juga meningkat karena harus menggunakan antibakteri dosis tinggi atau lebih dari satu macam antibakteri, atau menggunakan antibakteri baru yang harganya lebih mahal (Soeripto, 2002).

2.1.4 Mekanisme Infeksi

Penyebab bakteri yang tadinya bersifat flora normal pada kulit mejadi penyebab infeksi ada 3 faktor, yaitu: (1) Mikroorganisme itu sendiri (bakteri), (2) Faktor lingkungan yang kurang kondusif, (3) Kondisi inangnya (baik manusia maupun hewan). Adapun tahapan dari suatu mikroorganisme yang menginfeksi inangnya adalah sebagai berikut (Maksum Radji, 2010):

1. Perlekatan pada protein sel inang

Struktur sel *S. aureus* memiliki protein permukaan yang membantu penempelan bakteri pada sel inang. Protein tersebut adalah laminin dan fibronektin yang membentuk matriks ekstraseluler pada permukaan epitel dan endotel. Selain itu, beberapa galur mempunyai ikatan protein fibrin atau fibrinogen yang mampu meningkatkan penempelan bakteri pada darah dan jaringan

2. Invasi

Invasi merupakan proses bakteri masuk ke dalam sel inang/jaringan dan menyebar ke seluruh tubuh, akses yang mendalam dari bakteri supaya dapat melalui proses infeksi. Invasi *S. aureus* terhadap jaringan inang melibatkan sejumlah besar kelompok protein ekstraseluler. Beberapa protein yang berperan penting dalam proses invasi *S. aureus* adalah α -toksin, β -toksin, δ -toksin, γ -toksin,

leukosidin, koagulase, stafilokinase, dan beberapa enzim (protease, lipase, DNase, dan enzim pemodifikasi asam lemak).

3. Perlawanan terhadap ketahanan inang

S. aureus memiliki kemampuan mempertahankan diri terhadap mekanisme pertahanan inang. Beberapa faktor pertahanan diri yang dimiliki *S. aureus* yaitu: simpai polisakarida, protein A, dan leukosidin.

4. Pelepasan beberapa jenis toksin

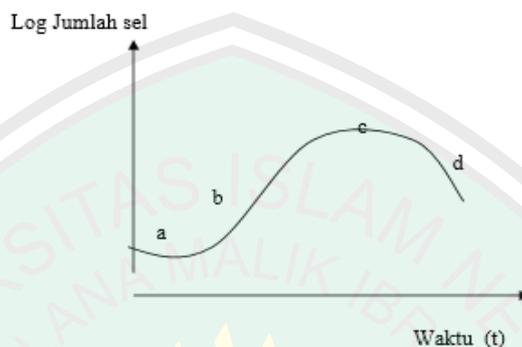
Pelepasan beberapa jenis toksin diantaranya yaitu eksotoksin, superantigen, dan toksin eksfoliatin.

2.2 Pertumbuhan Bakteri

Istilah pertumbuhan umum digunakan untuk bakteri dan mikroorganisme lain dan biasanya mengacu pada perubahan di dalam hasil panen sel (pertambahan total massa sel) dan bukan perubahan individu organisme. Selama fase seimbang (balanced growth), penambahan massa bakteri berbanding lurus dengan penambahan komponen seluler yang lain seperti DNA, RNA dan protein (Pelchzar, 2007).

Bakteri bereproduksi dengan cara membelah diri. Tidak semua spesies bakteri mempunyai waktu generasi yang sama. Apabila kita menginokulasikan sejumlah tertentu sel pada suatu medium yang segar, lalu menentukan populasi bakteri tersebut pada waktu-waktu tertentu selama periode inkubasi 24 jam (lebih atau kurang), dan memetakan logaritma jumlah sel terhadap waktu, maka kita memperoleh suatu kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan bakteri terdiri dari 4 fase utama, yaitu periode awal yang tampaknya tanpa pertumbuhan (fase

adaptasi), diikuti oleh suatu periode pertumbuhan yang cepat (fase log), kemudian mendatar (fase seimbang) dan akhirnya diikuti oleh suatu penurunan populasi sel hidup (fase kematian) (Pelczar, 2007).



Gambar 2.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri, menunjukkan empat fase pertumbuhan : (a) fase lag/adaptasi, (b) fase log, (c) fase stasioner/seimbang, (d) fase kematian (Pelczar, 2007).

Kurva tumbuh ini digunakan untuk menentukan fase mid log, yaitu fase pertumbuhan dimana terjadi kecepatan pembelahan sel tertinggi. fase mid log sering kali digunakan dalam penelitian karena pada fase tersebut sel-sel dalam kondisi aktif melakukan metabolisme. Pada fase tersebut terjadi pembelahan yang cepat sehingga dinding sel bakteri menjadi tipis dan efek perlakuan yang diberikan dapat terjadi secara maksimal (Tetrianan dan Sugoro, 2007). Menurut Alatas (2005), bahwa sel yang paling sensitif adalah sel dengan tingkat proliferasi yang tinggi (aktif melakukan pembelahan) dan tingkat diferensiasi yang rendah. Sedangkan sel yang resisten atau tidak mudah rusak yaitu sel dengan tingkat diferensiasi yang tinggi dan tidak aktif melakukan pembelahan.

Menurut Windusari (2008), diketahui bahwa *S. aureus* tidak mengalami fase adaptasi (lag fase) (berlangsung mulai pada pengamatan ke-0 hingga menit ke-60) dan langsung memasuki fase logaritmik (log fase) pada menit ke-120 pengamatan

hingga menit ke-270, selanjutnya memasuki fase stasioner pada menit ke-300. Kecepatan pembelahan tertinggi terjadi pada fase mid logaritmik yaitu pada menit ke-180. Digunakan fase bakteri pada fase mid log karena sel berada dalam metabolisme aktif. Proliferasi sel yang tinggi dan cepat, serta tingkat diferensiasi yang rendah mempengaruhi dinding sel menipis, sehingga efek radiasi dapat berlangsung maksimal.

Suhu merupakan salah satu faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba. Setiap mikroba mempunyai kisaran suhu dan suhu optimum tertentu untuk pertumbuhannya. Berdasarkan kisaran suhu pertumbuhan, mikroba dibedakan atas tiga kelompok sebagai berikut:

1. Psikrofil, yaitu mikroba yang mempunyai kisaran suhu pertumbuhan 0 – 20 °C.
2. Mesofil, yaitu mikroba yang mempunyai kisaran suhu pertumbuhan 20 – 45 °C.
3. Termofil, yaitu mikroba yang mempunyai suhu pertumbuhannya di atas 45 °C.

Bakteri patogen umumnya mempunyai suhu optimum pertumbuhan sekitar 37 °C, yang juga adalah suhu tubuh manusia. Oleh karena itu suhu tubuh manusia merupakan suhu yang baik untuk pertumbuhan beberapa bakteri patogen.

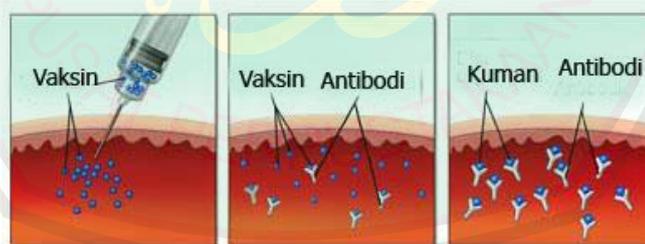
2.3 Vaksin

Vaksin berasal dari kata *vaccinia* yang merupakan suatu suspensi mikroorganisme yang dapat menimbulkan penyakit tetapi telah termodifikasi dengan cara mematikan atau meng-atenuasi (menghentikan transkripsi DNA pada suatu kodon, sehingga mRNA yang terbentuk lebih pendek dari biasanya), sehingga tidak akan menimbulkan penyakit dan dapat merangsang pembentukan

kekebalan atau antibodi apabila diinokulasi (Sugoro, 2004), atau hasil-hasil pemurniannya seperti protein, peptide, partikel serupa virus, dan sebagainya (Baratawijadja dan Karnen, G, 2004).

Vaksin adalah bahan antigenik yang digunakan untuk menghasilkan kekebalan aktif terhadap suatu penyakit, dan salah satu vaksin penghasil antibodi yaitu protein yang berperan untuk melawan bakteri yang biasa disebut antigen. Dan salah satu bagian sel bakteri yang berperan aktif sebagai faktor virulensi adalah protein (Lehtolainen, 2004).

Jenis-jenis vaksin menurut Tetriana (2007) ada 4 tipe, yaitu: (1) Vaksin inaktif dari organisme patogen yang dimatikan, (2) Vaksin aktif dari organisme yang dilemahkan, (3) Vaksin dengan subunit protein hasil rekombinasi, dan (4) Vaksin asam nukleat. Vaksin virus hidup umumnya dibuat dari virus galur khas yang virulensinya telah dilemahkan.



Gambar 2.4 Mekanisme kerja vaksin (Baratawijadja dan Karnen, G, 2004)

Pada gambar 2.4, menunjukkan mekanisme kerja vaksin, dimana ketika vaksinasi berlangsung, vaksin yang berasal dari virus, bakteri atau organisme yang telah mati maupun yang sudah dalam bentuk aman, disuntikkan ke dalam sistem (gambar kiri). Vaksin akan merangsang sistem kekebalan tubuh untuk memproduksi antibodi terhadap suatu organisme (gambar tengah). Ketika tubuh

terserang kuman atau bakteri dimasa datang, sel ingatan akan diaktifkan dan menjawab lebih cepat dan lebih kuat untuk menghancurkan bakteri (gambar kanan).

2.4 Vaksin Pemanasan

Pembuatan vaksin dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu kimia, pemanasan, serta iradiasi. Prinsip penting dalam pembuatan vaksin adalah metode dalam inaktivasi/pelemahan harus dapat memusnahkan inefektivitas dari organisme, tetapi sifat antigeniknya harus tidak berubah. Vaksin dapat diperoleh dengan cara konvensional, baik secara kimia maupun pemanasan. Vaksin konvensional yang umum digunakan adalah dengan menginaktivasi sel bakteri melalui pemanasan.

2.4.1 Pemanasan

Mikroorganisme dapat dikendalikan (dibasmi, dihambat, atau ditiadakan) dari suatu lingkungan, dengan menggunakan berbagai proses atau sarana fisik. Penggunaan suhu yang tinggi digabung dengan kelembaban tinggi merupakan salah satu metode paling efektif untuk mematikan mikroorganisme. Prosedur praktis yang memanfaatkan panas untuk mematikan mikroorganisme untuk mudahnya dibagi ke dalam dua kategori, yaitu : (1) Panas Lembab (2) Panas Kering (Pelczar, 2012).

Panas lembab mematikan mikroorganisme dengan cara mengkoagulasi protein-proteinnnya. Panas lembab mematikan mikroorganisme dengan jauh lebih cepat dibandingkan dengan panas kering, yang menghancurkan mikroorganisme

dengan cara mengoksidasi komponen-komponen kimiawinya. Telah disebutkan bahwa sel vegetatif bakteri jauh lebih peka terhadap panas dibandingkan dengan sporanya. Sel kebanyakan bakteri akan dimatikan dalam waktu 5-10 menit pada suhu 60 sampai 70 °C dengan panas lembab. Kebanyakan spora bakteri hanya akan terbunuh oleh suhu yang dipertahankan diatas 100 °C selama jangka waktu yang lama. Sel-sel vegetatif khamir dan cendawan lainnya biasanya terbunuh dalam waktu 5 sampai 10 menit dengan panas lembab pada suhu 50 sampai 60 °C (Pelczar, 2012).

2.4.2 Waktu Kematian Termal dan Waktu Pengurangan Desimal

Digunakan dua istilah untuk menyatakan resistansi bakteri terhadap panas, yaitu “waktu kematian termal” dan “waktu pengurangan desimal”. Waktu kematian termal mengacu pada periode waktu terpendek yang dibutuhkan untuk mematikan suatu suspensi bakteri pada suatu suhu tertentu dibawah keadaan tertentu. Waktu pengurangan desimal mengacu pada pengurangan khusus dalam hal jumlah sel hidup, yaitu lamanya waktu dalam menit untuk mengurangi populasi sebesar 90%. Dengan kata lain, yaitu lamanya waktu dalam menit yang dibutuhkan oleh kurva waktu kematian termal untuk mengalami satu pengurangan logaritmik. Dari definisi tersebut jelas bahwa hubungan waktu dan suhu adalah kritis untuk menetapkan kerentanan mikroorganisme terhadap panas (Pelczar, 2012).

2.5 Protein

Protein berasal dari kata proteos (utama atau pertama) merupakan senyawa makromolekul yang memiliki peranan penting pada setiap makhluk hidup. Protein adalah suatu polipeptida dengan bobot molekul yang sangat bervariasi, dari 5.000 hingga lebih dari satu juta. Protein memiliki beberapa fungsi, diantaranya sebagai enzim, zat pengatur pergerakan, pertahanan tubuh, alat pengangkut dan lain-lain tergantung sepenuhnya pada struktur 3-dimensional protein tersebut (Berg, 2002).

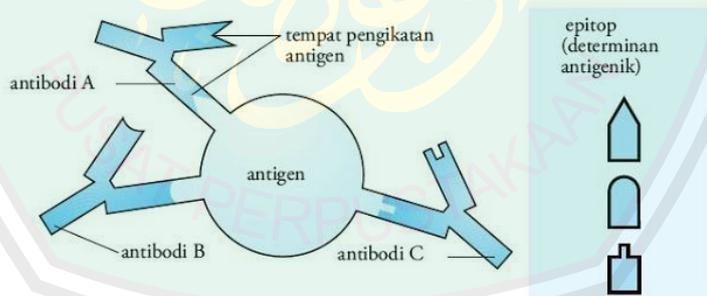
Ada beberapa jenis protein sangat peka terhadap perubahan lingkungannya. Apabila konformasi molekul protein berubah, misalnya oleh perubahan suhu, pH atau karena terjadi suatu reaksi dengan senyawa lain, ion-ion logam, maka aktivitas biokimiawinya berkurang. Perubahan konformasi alamiah menjadi konformasi tidak menentu merupakan suatu proses yang disebut denaturasi (Poedjiadi, 1994).

2.6 Antigen dan Antibodi

Antigen merupakan suatu suspensi yang apabila memasuki inang vertebrata menimbulkan respon kekebalan yang membawa kepada terbentuknya kekebalan. Respon kekebalan ini mengakibatkan pembentukan antibodi spesifik yang beredar di dalam aliran darah (*imunitas humoral*) atau merangsang peningkatan jumlah sel-sel reaktif khusus yang disebut limfosit (*imunitas yang diperantarai sel*). Baik antibodi maupun limfosit khusus akan bereaksi dengan antigen yang digunakan sebagai bahan untuk membentuk kekebalan. Ini merupakan jalur utama pertahanan internal tubuh terhadap mikroba patogenik (Pelczar, 2012).

Terdapat dua kelompok senyawa alamiah yang jelas bersifat imunogenik, artinya mempunyai kemampuan untuk merangsang respon kekebalan. Senyawa tersebut adalah protein dan polisakaride. Protein pada umumnya lebih efektif dalam merangsang pembentukan antibodi dibandingkan polisakaride. Antigen dapat berupa substansi yang dapat larut seperti toksin bakteri atau protein serum (sebagai zat alir dari darah yang terkoagulasi). Antigen dapat pula bersifat partikulat, seperti sel bakteri. Antigen adalah substansi yang mempunyai berat molekul tinggi. Suatu senyawa dengan berat molekul kurang dari 6.000 dalton jarang sekali dapat bekerja sendiri sebagai antige. Kebanyakan antigen memiliki berat molekul 10.000 dalton atau lebih (Pelczar, 2012).

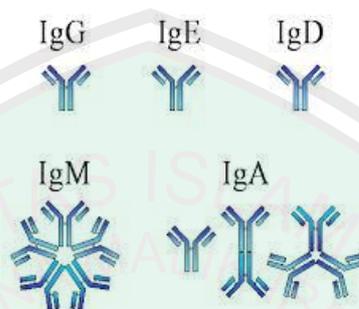
Substansi manapun mempunyai sejumlah situs reaktif atau determinan antigenik pada permukaannya atau pada bagian dalamnya (Pelczar, 2012).



Gambar 2.5 Penyajian skematik situs reaksi antigen. Interaksi antara antigen dan antibodi dipengaruhi oleh determinan antigenik (epitop) (Rochman, 2009).

Antibodi didefinisikan sebagai suatu substansi khusus yang dibentuk oleh tubuh sebagai respon terhadap stimulasi antigenik. Semua molekul antibodi termasuk kedalam kelas khusus protein serum yang disebut globulin, meskipun tidak semua globulin serum merupakan antibodi. Jadi antibodi disebut juga *imunoglobulin* (disingkat Ig). Ada 5 kelas imunoglobulin, yaitu: imunoglobulin G

(Ig G), imunoglobulin A (Ig A), imunoglobulin M (Ig M), imunoglobulin D (Ig D), dan imunoglobulin E (Ig E) yang kesemuanya terbuat dari unit struktural yang sama atau monomerik (Pelczar, 2012).



Gambar 2.6 Struktur berbagai kelas imunoglobulin. Ig G, Ig D, dan Ig E terdiri dari monomer. Ig M molekul besar yang mempunyai lima monomer dalam formasi bintang. Ig A mempunyai tiga bentuk bila muncul dalam serum, terdiri dari satu, dua, atau tiga monomer (Pelczar, 2012).

Beberapa ciri lainnya dari masing-masing imunoglobulin dirangkum dalam tabel berikut:

Tabel 2.1 Ciri-ciri biologis beberapa kelas imunoglobulin (Pelczar, 2012).

Imunoglobulin	Situs tempat dijumpainya	Pengikatan komplemen*	Melintasi plasenta	Fungsi
Ig G	Zat alir tubuh internal, terutama ekstrasvaskular	+	+	Jalur utama pertahanan diri terhadap infeksi selama beberapa minggu pertama setelah kelahiran bayi; mengikat mikroorganisme untuk mengikat fagositosisnya.
Ig M	Sebagian besar terbatas pada peredaran darah	+	-	Sarana sitolitik dan pengaglutinasi yang efisien; jalur pertahanan pertama diri yang efektif dalam kasus bakteremia (bakteri dalam darah).

Ig A	Serum, sekresi tubuh eksternal	-	-	Melindungi permukaan mukosa dari serangan mikroba patogenik.
Ig D	Serum, pada permukaan limfosit bayi yang baru lahir	-	-	Pengaturan sintesis imunoglobulin lain.
Ig E	Serum	-	-	Menyebabkan reaksi alergis akut berat dan kadang-kadang fatal; memerangi infeksi parasitik.

2.7 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan proses bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik bergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Dengan demikian elektroforesis dapat digunakan untuk separasi makromolekuler (seperti protein dan asam nukleat). Posisi molekul yang terseparasi pada gel dapat dideteksi dengan pewarnaan atau autoradiografi, ataupun dilakukan dengan densitometer (Ikmalia, 2008).

Menurut Yuwono (2005), elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul seluler berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Kecepatan gerak molekul tergantung pada rasio muatan terhadap massanya, serta tergantung pula pada bentuk molekulnya.

Suatu molekul yang bermuatan akan bergerak dalam medan listrik. Fenomena ini dikenal sebagai elektroforesis, dapat digunakan untuk memisahkan protein atau makromolekul lain seperti DNA dan RNA. Kecepatan migrasi (v)

protein atau makromolekul lain dalam medan listrik tergantung pada kekuatan medan listrik (E), muatan protein (z), dan koefisien gesekan (f).

$$v = \frac{E \cdot z}{f} \dots\dots\dots(2.1)$$

Kekuatan listrik ($E \cdot z$) yang menggerakkan molekul ke arah elektroda yang bermuatan berlawanan dihambat oleh $f \cdot v$ yang timbul akibat gesekan molekul pada medium. Koefisien gesekan (f) tergantung pada massa dan bentuk molekul yang bergerak dan viskositas (η) medium (Lehninger, 1994).

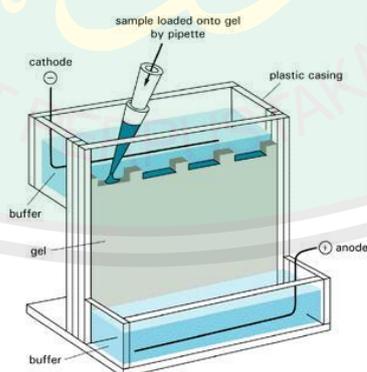
Kegunaan elektroforesis antara lain (Ikmalia, 2008):

1. Menentukan berat molekul (estimasi). Penetapan BM secara lebih teliti dapat dilakukan dengan ultrasentrifuge, meskipun dengan elektroforesis cukup memenuhi syarat.
2. Dapat mendeteksi terjadinya pemalsuan bahan.
3. Dapat mendeteksi terjadinya kerusakan bahan seperti protein dalam pengolahan dan penyimpanan.
4. Untuk memisahkan spesies molekul yang berbeda secara kualitatif maupun kuantitatif, yang selanjutnya masing-masing spesies dapat dianalisis.
5. Menetapkan titik isoelektrik protein.

Pemisahan secara elektroforesis hampir selalu dilakukan didalam gel, tidak dalam larutan dengan dua alasan, pertama gel mengurangi arus listrik yang timbul akibat perbedaan suhu yang kecil yang diperlukan agar pemisahan menjadi efektif. Kedua, gel bertindak sebagai saringan molekul yang meningkatkan pemisahan. Media pilihan pada elektroforesis adalah gel poliakrilamida, sebab

secara kimiawi bersifat *inert* dan dapat dengan mudah dibentuk. Selain itu ukuran porinya dapat diatur dengan memilih berbagai konsentrasi reagen pengikatnya pada saat polimerisasi (Sudjadi, 2008).

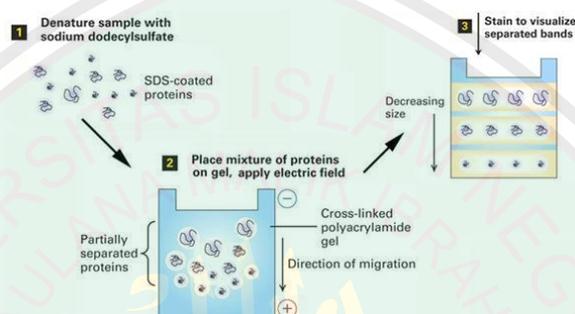
Salah satu jenis elektroforesis adalah elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Elektrophoresis*). Pada mekanisme SDS-PAGE, protein bereaksi dengan SDS yang merupakan detergen anionik membentuk kompleks yang bermuatan negatif. Protein akan terdenaturasi dan terlarut membentuk kompleks berikatan dengan SDS, berbentuk elips dan batang, dan berukuran sebanding dengan berat molekul protein. Protein dalam bentuk kompleks yang bermuatan negatif ini terpisahkan berdasarkan muatan dan ukurannya secara elektroforesis di dalam matriks gel poliakrilamid. Berat molekul protein dapat diukur dengan menggunakan protein standar yang telah diketahui berat molekulnya (Ummubalqis, 2000).



Gambar 2.7 SDS-PAGE (Sudjadi, 2008).

Protein dapat dipisahkan berdasarkan ukuran massanya dengan elektroforesis gel poliakrilamid dengan sistem tegak. Sebelumnya campuran protein dipanasi dengan sodium dedosil sulfat (SDS), suatu detergen anionik yang

menyelubungi molekul protein. Penyelubungannya ini menyebabkan interaksi non-kovalen terganggu sehingga molekul protein dalam struktur primer. Anion SDS berikatan dengan rantai utama dengan rasio satu molekul SDS untuk dua residu asam amino (Sudjadi, 2008).



Gambar 2.8 Prinsip Kerja SDS PAGE ((1) Denaturasi sampel dengan SDS menyelubungi protein. (2) Penempatan protein sampel pada gel kemudian dialiri listrik. (3) pewarnaan untuk visualisasi pemisahan pita.) (Stryer, 2002).

Sistem dapar yang umumnya digunakan pada elektroforesis protein dengan SDS adalah sistem dapar diskontinu. Sistem ini menggunakan ion dapar yang berbeda dalam gel dan larutan dapar elektroda. Keunggulan sistem ini adalah pemisahan protein berlangsung lebih baik dan lebih tajam. Gel yang digunakan dalam sistem ini adalah gel penumpuk (*stacking gel*) yang berpori besar dan gel pemisah (*separating gel*) yang berpori kecil. Sedangkan sampel diletakkan diatas gel penumpuk. Molekul sampel yang melewati gel penumpuk dengan cepat akan bertumpuk dalam satu zona yang sempit (*stacks*). Sampel yang bertumpuk itu akan bergerak sepanjang gel penumpuk yang berpori besar dan kemudian masuk ke gel pemisah berpori kecil sebagai suatu pita tipis setelah memasuki gel pemisah, molekul sampel terpisah berdasarkan muatan dan ukuran (Yuwono, 2008).

2.8 Viabilitas

Menurut KBBI (Kamus Besar Bahasa Indonesia) menyatakan bahwa viabilitas adalah kemungkinan untuk dapat hidup. Viabilitas berarti kelangsungan hidup, aktivitas hidup atau kemungkinan hidup yang ditunjukkan dengan pertumbuhannya (pada bakteri). Pengetahuan dan pengertian tentang faktor-faktor yang mempengaruhi kemampuan tersebut sangat penting untuk dapat mengendalikan mikroorganisme. Beberapa faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme meliputi suplai zat gizi, waktu, suhu, air, pH dan tersedianya oksigen (Winarwi, 2006).

a. Suplai Zat Gizi

Seperti halnya makhluk lain, mikroorganisme juga membutuhkan suplai makanan yang menjadi sumber energi dan menyediakan unsur-unsur kimia dasar untuk pertumbuhan sel. Unsur-unsur dasar tersebut adalah karbon, nitrogen, hydrogen, oksigen, sulfur, fosfor, magnesium, zat besi dan sejumlah kecil logam lainnya.

b. Waktu

Bila suatu sel mikroorganisme diinokulasi pada media nutrient segar, pertumbuhan yang terlihat mula-mula adalah suatu pembesaran ukuran, volume dan berat sel. Ketika ukurannya telah mencapai kira-kira dua kali dari besar normal, sel tersebut membelah dan menghasilkan dua sel. Sel-sel tersebut kemudian tumbuh dan membelah diri menghasilkan empat sel dan seterusnya. Selama kondisi memungkinkan, pertumbuhan dan pembelahan sel berlangsung terus sampai sejumlah besar populasi terbentuk. Waktu antara masing-masing

pembelahan sel berbeda-beda tergantung dari spesies dan kondisi lingkungannya, tetapi untuk kebanyakan bakteri waktu ini berkisar antara 10-60 menit. Tipe pertumbuhan yang cepat ini disebut pertumbuhan logaritmis atau eksponensial.

c. Suhu

Suhu adalah salah satu faktor lingkungan paling penting yang mempengaruhi kehidupan dan pertumbuhan mikroorganisme. Suhu dapat mempengaruhi mikroorganisme dalam dua cara yang berlawanan yaitu: 1) Apabila suhu naik, kecepatan mikroorganisme naik dan pertumbuhan dipercepat. Sebaliknya apabila suhu turun, kecepatan metabolisme juga turun dan pertumbuhan diperlambat, 2) Apabila suhu naik atau turun, tingkat pertumbuhan mungkin terhenti, komponen sel menjadi tidak aktif dan sel-sel dapat mati.

d. Nilai pH

Setiap organisme mempunyai kisaran nilai pH dimana pertumbuhan masih memungkinkan dan masing-masing biasanya mempunyai pH optimum. Kebanyakan mikroorganisme dapat tumbuh pada kisaran pH 6,0-8,0 dan nilai pH diluar kisaran 2,0 dan 10,0 biasanya bersifat merusak.

e. Aktifitas Air

Semua mikroorganisme membutuhkan air untuk kehidupannya. Air berperan dalam reaksi metabolik dalam sel dan merupakan alat pengangkut zat-zat gizi atau bahan limbah kedalam dan keluar sel.

f. Ketersediaan Oksigen

Mikroorganisme berbeda nyata dalam kebutuhan oksigen guna metabolismenya. Beberapa kelompok dapat dibedakan menjadi : (1) Organisme

Aerobik, dimana tersedianya oksigen dan penggunaannya dibutuhkan untuk pertumbuhan, (2) Organisme Anaerobik, dimana tidak dapat tumbuh dengan adanya oksigen dan akan menjadi racun jika ada oksigen bagi organisme tersebut, (3) Organisme Anaerobik Fakultatif, dimana oksigen akan dipergunakan apabila tersedia, dan jika tidak tersedia organisme tetap dapat tumbuh dalam keadaan anaerobik, (4) Organisme Mikroerofilik yaitu mikroorganisme yang lebih dapat tumbuh pada kadar oksigen yang lebih rendah dari pada kadar oksigen dalam atmosfer (Winarwi, 2006).



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2015 – selesai di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Riset Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang serta Laboratorium Sentra Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian dengan metode analisis dan eksperimen, yaitu inaktivasi bakteri dengan pemanasan variasi suhu (40 °C, 45 °C, dan 50 °C) dan waktu (10, 20, dan 30 menit), penentuan viabilitas dengan perhitungan koloni bakteri dengan teknik pengenceran, serta analisa profil protein menggunakan elektroforesis SDS-PAGE, yang bertujuan untuk mengetahui kecenderungan profil protein isolat *Staphylococcus aureus* hasil pemanasan dengan variasi suhu dan waktu sebagai bahan vaksin.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: autoklaf, tabung *ependorf*, jam tangan, penangas air, sentrifuge 10.000 rpm, mikropipet, sarung tangan, botol semprot, neraca analitik, gelas ukur, gelas bekker, labu erlemeyer 500 ml, tabung reaksi, magnetic stirrer, magnetic heating stirer, cawan petri,

inkubator, kertas alumunium foil, plastik, cawan petri, sonikator, vortex, inkubator shaker, Laminar Air Flow (LAF), masker, tips, kapas, ose, tabung sentrifuge, coloni counter, busen, korek api.

3.3.2 Bahan Penelitian

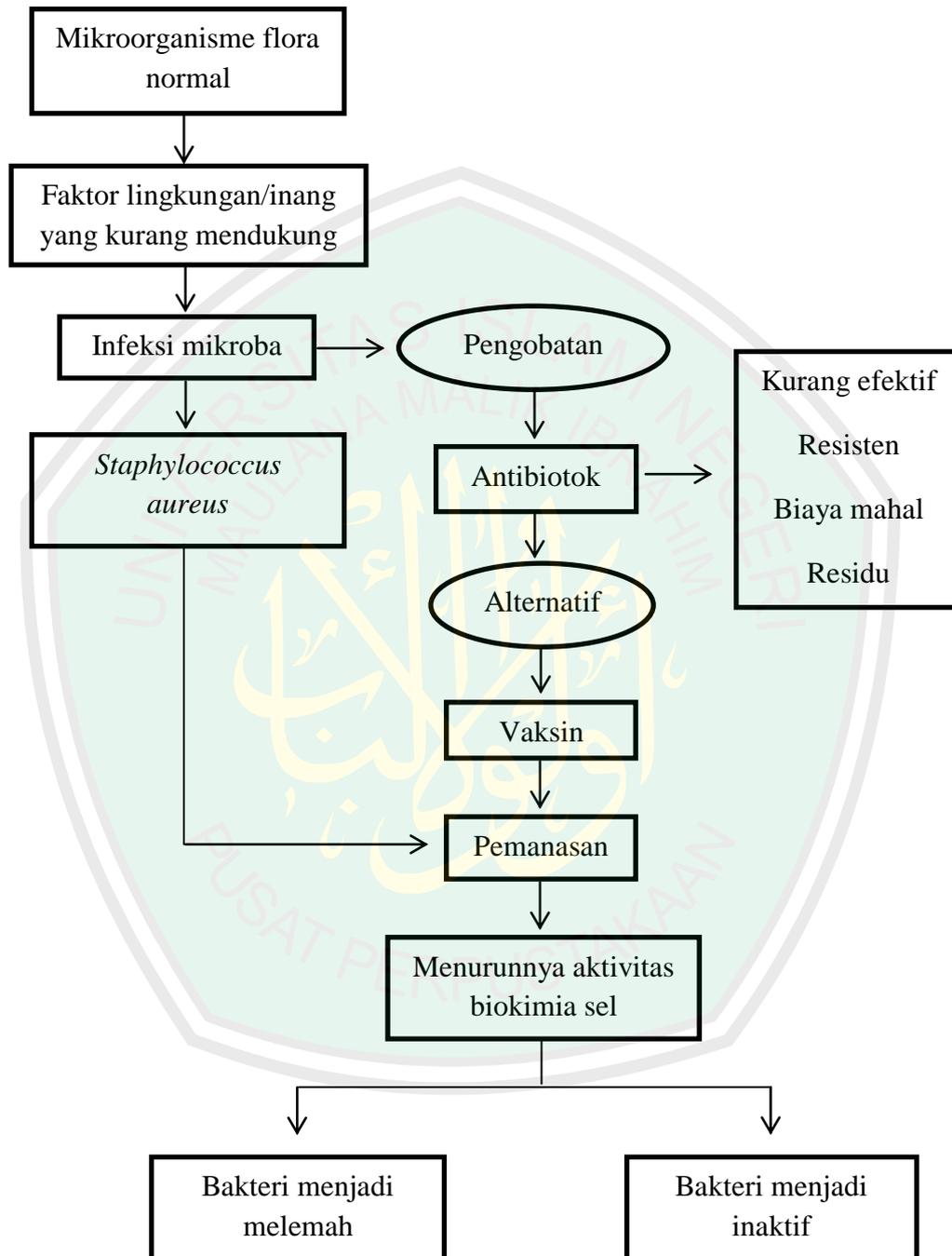
Bahan yang digunakan antara lain adalah isolat murni bakteri *Staphylococcus aureus*, alkohol 70%, aquades steril, aquabides, media NB, Media NA, NaCl 0.85%, aseton, Acrylamide solution, separating gel buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8), stacking gel buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8), 10% ammonium persulfate, TEMED (Tetramethylethylenediamine), coomassie brilliant blue staining, dan destain solution coomassie R-250.

3.4 Definisi Operasional

- a. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) merupakan bakteri patogen dari golongan gram positif, yang dapat menyebabkan berbagai penyakit terutama infeksi. Di penelitian ini isolat bakteri berasal dari biakan murni.
- b. Suhu adalah salah satu faktor yang digunakan dalam penelitian ini.
- c. Waktu adalah salah satu faktor yang digunakan dalam penelitian ini.
- d. Viabilitas merupakan kemungkinan bakteri untuk hidup yang ditunjukkan dengan pertumbuhannya, ketika diberi keadaan yang mencekam. Dalam penelitian ini, keadaan mencekam yang dimaksud adalah perubahan suhu lingkungan dan lamanya perubahan suhu tersebut.

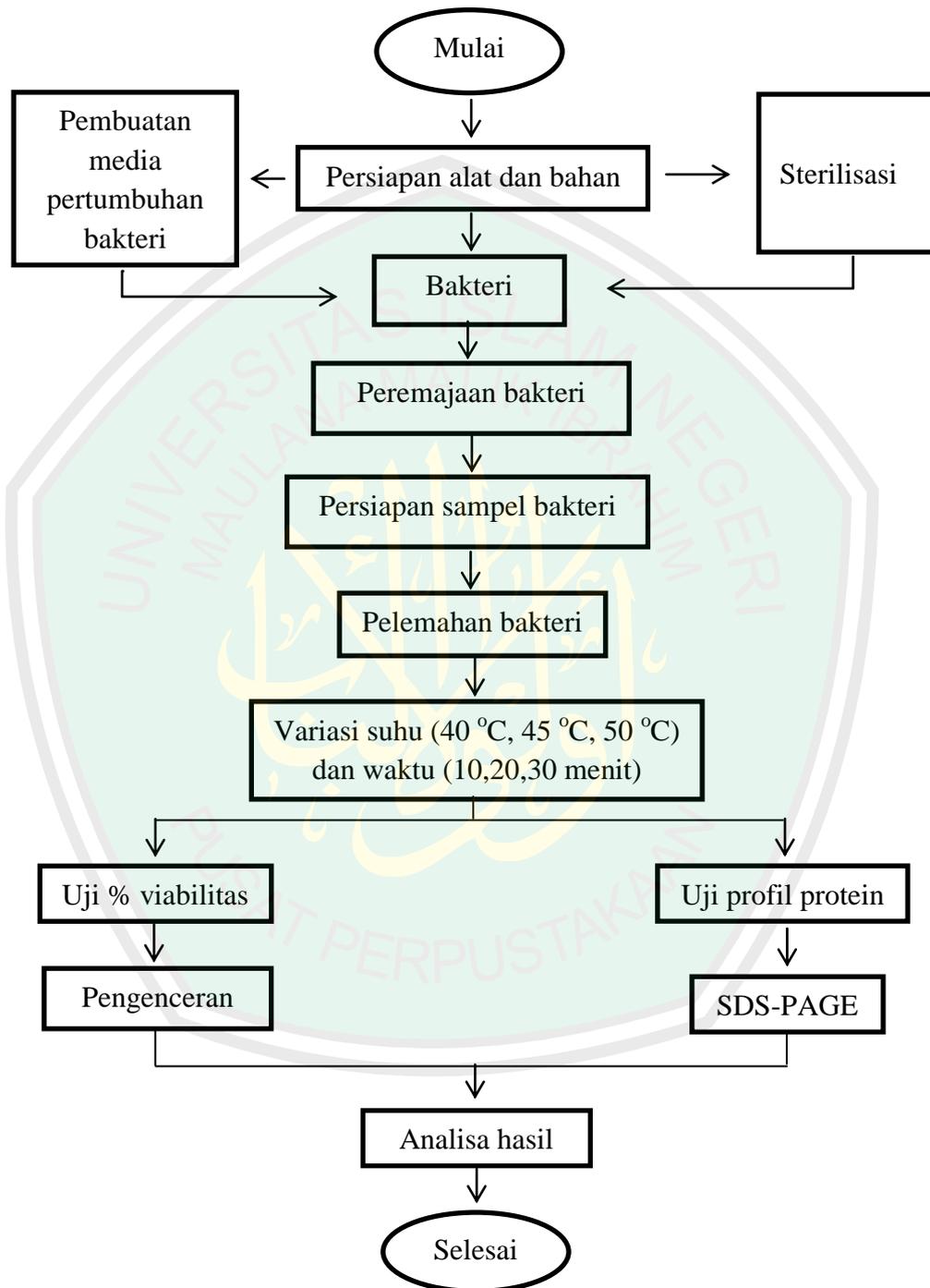
- e. Pengenceran merupakan metode yang digunakan dalam pengujian viabilitas setelah diberi perlakuan dengan variasi suhu dan waktu yang nantinya akan dihitung jumlah bakterinya menggunakan coloni counter.
- f. Protein *S. aureus* merupakan protein yang diisolasi dari bakteri *Staphylococcus aureus* setelah perlakuan dengan variasi suhu dan waktu.
- g. Elektroforesis adalah suatu proses pemisahan molekul protein berdasarkan ukurannya.
- h. Metode *Sodium-dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Elektrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan metode elektroforesis vertikal dengan menggunakan gel polyacrylamide dan SDS.
- i. Pita protein merupakan protein bakteri *S. aureus* yang telah terpisah-pisah berdasarkan berat molekul dan ukurannya, membentuk garis-garis tebal dan tipis hasil dari elektroforesis SDS-PAGE.

3.5 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

3.6 Prosedur Penelitian



Gambar 3.2 Prosedur Penelitian

3.7 Prosedur Kerja

3.7.1 Sterilisasi

Sterilisasi alat dilakukan sebelum semua peralatan digunakan, yaitu dengan cara membungkus semua peralatan dengan menggunakan kertas alumunium foil kemudian di masukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi (*per square inci*) selama 15 menit. Untuk alat yang tidak tahan panas tinggi disterilisasi dengan zat kimia berupa alkohol 70 % (Maharezain, 2014).

3.7.2 Pembuatan Medium NA (*Nutrien Agar*)

Ditimbang 5 gr medium NA lalu dimasukkan ke dalam erlemeyer 500 ml, dilarutkan dengan ditambah aquadest sebanyak 250 ml, dan dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer di atas pemanas. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml dan sisanya dimasukkan ke dalam erlemeyer kemudian ditutup dengan kapas lalu disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam cawan petri dan ditunggu sampai agarnya membeku (Maharezain, 2014).

3.7.3 Pembuatan Medium NB (*Nutrien Borth*)

Ditimbang 2.5 gr media NB lalu dimasukkan ke dalam erlemeyer 500 ml, dilarutkan dengan ditambah aquadest sebanyak 250 ml, dan dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer di atas pemanas. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung sebanyak 50 ml kemudian ditutup dengan kapas lalu disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, setelah itu ditunggu sampai agarnya membeku (Maharezain, 2014).

3.7.4 Pelemahan *Staphylococcus aureus* dengan Pemanasan

Kultur bakteri ditumbuhkan dengan cara mengambil satu ose isolat *Staphylococcus aureus* ke dalam medium NA miring. Disimpan di inkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kultur yang tumbuh diambil dua ose untuk diinokulasikan ke dalam erlenmeyer berisi NB 100 ml dan diinkubasi pada inkubator shaker dengan suhu 37 °C pada agitasi 120 rpm selama 24 jam. Setelah 24 jam, kultur disentrifugasi pada suhu 4 °C selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm dan dibilas dua kali dengan NaCl 0.85%. Pelet yang diperoleh diencerkan hingga jumlah sel 3×10^8 sel/ml dan ditempatkan pada tabung eppendorf sebanyak 4 ml. Kultur kemudian dipanaskan dalam inkubator dengan variasi suhu 40, 45, dan 50 °C selama 10, 20, dan 30 menit. Kultur hasil pemanasan ditanam kembali dalam medium NA dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, pengujian viabilitas dilakukan untuk penentuan *Lethal Dose 50%* (LD_{50}) yang dipetakan pada kurva persentasi viabilitas bakteri yang bertahan hidup paska perlakuan.

3.7.5 Pengujian viabilitas dengan teknik pengenceran (Maharezain, 2014).

1. Diambil 1 ml suspensi dari botol medium yang sudah diberi perlakuan pemanasan dengan variasi suhu dan waktu kemudian dimasukkan kedalam botol flakon steril yang berisi 9 ml aquades dan diberi tanda 10^{-1} .
2. Diambil kembali 1 ml dari suspensi 10^{-1} yang sudah dihomogenkan kemudian dimasukkan ke dalam botol flakon steril yang berisi 9 ml aquades sebagai pengenceran 10^{-2} .

3. Diambil kembali 1 ml dari suspensi 10^{-2} yang sudah dihomogenkan kemudian dimasukkan ke dalam botol flakon steril yang berisi 9 ml aquades sebagai pengenceran 10^{-3} .
4. Diambil kembali 1 ml dari suspensi 10^{-3} yang sudah dihomogenkan kemudian dimasukkan ke dalam botol flakon steril yang berisi 9 ml aquades sebagai pengenceran 10^{-4} .
5. Dilakukan pengenceran sampai pengenceran 10^{-7} .
6. Dituangkan suspensi pada pengenceran 10^{-5} . 10^{-6} . 10^{-7} sebanyak 1000 μ l ke dalam cawan petri steril kemudian dituangkan media NA cair kira-kira sebanyak 15 ml. Setelah itu dihomogenkan.
7. Dilakukan semua proses diatas secara aseptis yaitu di dekat api bunsen.
8. Dimasukkan ke dalam inkubator dengan posisi terbalik (bagian tutup berada dibawah) setelah media tersebut membeku.
9. Diinkubasi selama 24 jam.
10. Dihitung bakteri *Staphylococcus aureus* dan diberi tanda dengan spidol untuk menghindari penghitungan ulang.

3.7.6 Karakterisasi Profil Protein *Staphylococcus aureus* Menggunakan SDS-PAGE

Pada penelitian ini menggunakan metode elektroforesis 1 dimensi SDS-PAGE dengan sistem buffer Laemmli. Konsentrasi gel poliakrilamida yang digunakan adalah 12% (Ikmalia, 2008):

1. Persiapan sampel

Kultur hasil pemanasan dengan variasi suhu dan waktu yang berbeda disentrifuge pada suhu 4 °C selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Pelet yang dihasilkan ditambah dengan sample buffer 1000 µl dan dimasukkan dalam tabung eppendorf kemudian divorteks, setelah itu disonikasi selama 5 menit dengan amplitudo 40% pada suhu rendah. Sampel lalu sentrifuge selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Diambil supernatnya dan ditambah PMSF dan divortek hingga homogen. Diambil sebanyak 20 µl supernata yang telah ditambah PMSF kemudian ditambah dengan 20 µl RSB dan dididihkan selama ± 5 menit di air yang mendidih.

2. Persiapan komponen larutan untuk elektroforesis SDS-PAGE

a. Acrylamide/Bis (30%)

Disiapkan 7.3 gr acrylamide dan 0.2 gr N'N'-bis-methylene-acrylamide. Kemudian dilarutkan dalam aquabides 50 ml dan divorteks hingga homogen.

b. 10 % SDS

Larutkan 10 gram SDS dalam 90 ml air dengan diaduk perlahan dan dimasukkan 100 ml DDH₂O.

c. 1,5 M Tris-Hcl, pH 8,8

Disiapkan 1,82 gr Tris base dan dilarutkan dalam 10 ml DDH₂O. Kemudian diaduk hingga homogen. Sesuaikan pada pH 8,8 dan disimpan pada suhu 4°C. Komposisi ini digunakan untuk *separating gel buffer*.

d. 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

Disiapkan 1 gr Tris base dan dilarutkan dalam 10 ml DDH₂O. Kemudian diaduk hingga homogen. Sesuaikan pada pH 6,8. Disimpan pada suhu 4°C. Komposisi ini digunakan untuk *stacking gel buffer*.

e. *Sample buffer*

Disiapkan 3,55 ml aquabides dan ditambahkan 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8. Kemudian ditambahkan 2,5 ml glycerol, 2 ml 10% SDS, 0,2 ml 0,5% Bromophenol blue dan diaduk hingga homogen.

f. *Running buffer* pH 8,3

Disiapkan 30,3 Tris-base, 144 gr glycine, 10 gram SDS dan dilarutkan dalam 1 liter DDH₂O. Kemudian diaduk hingga homogen.

g. APS 10% (dibuat sebelum pemakaian)

Disiapkan 0,1 gr ammonium persulfate dan dilarutkan dalam 1 ml DDH₂O. Kemudian diaduk hingga homogen.

3. Persiapan gel elektroforesis

a. Separating gel (12%)

30% *Acrylamide/Bis solution* 4 ml ditambahkan separating gel buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8) sebanyak 2.5 ml, kemudian aquabidest 3.4 ml, ditambah 10% SDS sebanyak 0.1 ml dan 10% ammonium persulfate 0.1 ml serta TEMED 0.01 ml.

b. Stacking gel (4%)

30% *Acrylamide/Bis solution* 1.3 ml ditambahkan stacking gel buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) sebanyak 2.5 ml, kemudian aquabidest 6.1 ml,

ditambah 10% SDS sebanyak 0.1 ml dan 10% ammonium persulfate 0.1 ml serta TEMED 0.01 ml.

4. Pembuatan kolom gel

Setelah separating gel dibuat kemudian dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam alat elektroforesis dengan mikropipet, lalu ditambahkan aquabidest untuk meratakan separating gel tersebut. Setelah separating gel membeku dimasukkan stacking gel sedikit demi sedikit, lalu pasang sisir pembentuk kolom biarkan hingga stacking gel membeku lalu diangkat sisirnya. Kemudian dipasang hasil gel tersebut pada perangkat elektroforesis.

5. Loading sampel

Larutan buffer dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis. Kemudian sampel sebanyak 30 μ l dimasukkan ke dalam kolom gel dengan hati-hati lalu dielektroforesis selama \pm 45 menit pada 200 Volt.

6. Pewarnaan gel

Gel diangkat lalu diwarnai dengan *coomassie brilliant blue staining* gel warna biru Coomassie R-250, selama \pm 24 jam.

7. Pencucian gel

Gel dicuci dengan larutan *destain solution coomassie* R-250, selama \pm 1 hari. Selanjutnya hasil pencucian discan.

3.8 Teknik Pengumpulan Data

Data yang telah diperoleh kemudian diolah. Data berupa hasil perhitungan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai data hasil uji viabilitas, yang

nantinya akan dihitung juga prosentase viabilitasnya dengan persamaan (Tuasikal, 2006):

$$\%viabilitas = \frac{\text{jumlah koloni bakteri hidup setelah radiasi}}{\text{jumlah koloni bakteri hidup tanpa radiasi}} \times 100\% \dots \dots \dots (3.1)$$

Tabel 3.1 Data Hasil Uji Viabilitas

Suhu (°C)	Waktu (menit)	Jumlah Bakteri (CFU/ml)			Rata-Rata (CFU/ml)	% Viabilitas
		P1	P2	P3		
Kontrol	0					
40	10					
	20					
	30					
45	10					
	20					
	30					
50	10					
	20					
	30					

Keterangan : P1 : Pengulangan ke-1
P2 : Pengulangan ke-2
P3 : Pengulangan ke-3

3.9 Analisa Data

Untuk menganalisis data hasil elektroforesis SDS-PAGE, gel hasil pencucian di scan dan dihitung bobot molekulnya menggunakan rumus:

$$BM \text{ Sampel} = \log^{-1}(\log BM \text{ Sampel}) \dots \dots \dots (3.2)$$

$$\log BM \text{ Sampel} = \frac{(RF \text{ kecil} - RF \text{ Sampel})}{(RF \text{ kecil} - RF \text{ besar})} \times (\log BM \text{ Besar} - \log BM \text{ kecil}) + \log BM \text{ kecil} \dots \dots \dots (3.3)$$

$$RF = \frac{\text{tracking}}{\text{panjang gel keseluruhan}} \dots \dots \dots (3.4)$$

Untuk analisis data statistik digunakan uji normalitas untuk mengetahui bahwa data terdistribusi normal dan analisis varian (Anova) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisa Prosedur

4.1.1 Pewarnaan Gram Bakteri *Staphylococcus aureus*

S. aureus merupakan bakteri gram positif yang berbentuk bulat, hidup secara berkoloni seperti buah anggur dan berwarna kuning keemasan. *S. aureus* dibedakan dari spesies *Staphylococcus* lainnya dengan melihat dari produksi koagulasenya. *S. aureus* memiliki morfologi, struktur dan sifat-sifat yang khas. Salah satu cara untuk mengidentifikasi *S. aureus* ialah dengan metode pewarnaan sel bakteri, sehingga sel dapat terlihat secara jelas dan mudah untuk diamati. Hal tersebut juga untuk mengetahui reaksi dinding sel bakteri melalui serangkaian pewarnaan (Lestari, 2013).

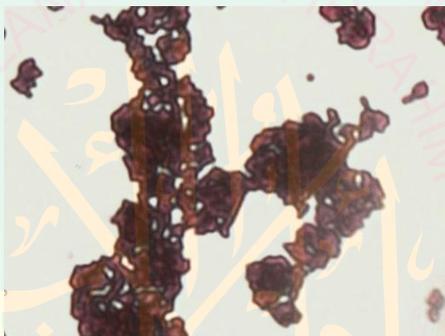
Pewarnaan dilakukan karena mikroba sulit dilihat dengan cahaya karena tidak mengadsorpsi atau membiaskan cahaya. Alasan inilah yang menyebabkan zat warna digunakan untuk mewarnai mikroorganisme. Zat warna mengadsorpsi dan membiaskan cahaya sehingga kontras mikroba dengan sekelilingnya dapat ditingkatkan. Penggunaan zat warna memungkinkan pengamatan struktur seperti spora, flagela, dan bahan inklusi yang mengandung zat pati dan granula fosfat (Lestari, 2013).

Pewarnaan sederhana merupakan teknik yang paling umum digunakan, karena hanya menggunakan suatu jenis zat warna untuk mewarnai organisme tersebut. Kebanyakan bakteri mudah bereaksi dengan pewarnaan karena sitoplasmanya bersifat basofilik (suka dengan keadaan basa). Dengan pewarnaan

dapat mengetahui bentuk dan rangkaian sel-sel bakteri. Metode pewarnaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pewarnaan gram, dengan tujuan membedakan spesies bakteri *S. aureus* ini termasuk dalam kelompok gram positif atau negatif (Lestari, 2013). Adapun langkah dalam pengujian bakteri dengan teknik pewarnaan gram adalah sebagai berikut : Bakteri yang telah diremajakan dalam medium NA diambil 1 ose menggunakan jarum ose, kemudian meletakkannya diatas obyek glass dan diratakan kira-kira seluas 1 cm². Sebelumnya obyek glass telah diberi aqudest steril, ini bertujuan agar bakteri yang telah diambil dari medium padat dapat diratakan tipis, jika tidak merata maka bakteri akan tertimbun dan pemeriksaan morfologinya tidak akan jelas. Tunggu hingga kering, setelah itu fiksasi di atas bunsen secara perlahan, supaya bakteri benar-benar melekat pada obyek glass. Fiksasi bakteri dikerjakan pada kondisi lingkungan yang steril. Setelah difiksasi kemudian ditetesi zat pewarna kristal violet sebanyak satu tetes, yang merupakan cairan utama dalam pewarnaan gram, berfungsi untuk menentukan sifat dari bakteri yang diuji. Kemudian diratakan dengan digoyangkan. Zat pewarna diberi waktu beberapa lama agar dapat diserap oleh bakteri yang sudah kering, setelah pewarna terserap dan kering, maka dibilas dengan air yang mengalir.

Cairan kedua yang ditetaskan adalah mordan atau larutan iodine, cairan ini berwarna kecoklatan, merupakan senyawa yang digunakan untuk mengintensifkan warna utama. Diratakan iodine pada obyek glass dan tunggu kurang lebih 1 menit, setelah itu cuci dengan air yang mengalir. Selanjutnya yang ditetaskan adalah decolourize, cairan ini berwarna putih bening, memiliki sifat membersihkan

cairan sebelumnya. Dan cairan terakhir yang diteteskan adalah safranin 0.5%, merupakan cairan penutup atau zat warna kedua, berwarna merah dan berfungsi untuk mewarnai kembali sel-sel yang telah kehilangan cat utama. Diamkan kurang lebih 1 menit dan bilas menggunakan air yang mengalir, tunggu hingga obyek glass kering sempurna, selanjutnya amati menggunakan mikroskop inferted. Dan hasil pengujian dengan pewarnaan yang telah diamati dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil Pengujian Bakteri *S. aureus* dengan perbesaran 40x

Bakteri gram positif merupakan bakteri yang dapat mempertahankan zat warna metil ungu sewaktu proses pewarnaan gram. Bakteri jenis ini akan berwarna biru atau ungu dibawah mikroskop, sedangkan bakteri gram negatif akan berwarna merah muda. Perbedaan klasifikasi antara kedua jenis bakteri ini terutama didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri (Aditya, 2010). Bakteri gram positif memiliki selapis dinding sel berupa peptidoglikan yang tebal. Setelah pewarnaan dengan kristal violet, pori-pori dinding sel menyempit akibat dekolorisasi oleh alkohol sehingga dinding sel tetap menahan warna biru (Fitria, 2009). Pada gambar 4.1 terlihat bahwa bakteri *S. aureus* yang telah diuji dengan

menggunakan pewarnaan gram memiliki warna yang kehitaman dengan sedikit warna merah.

Warna kehitaman ini dikarenakan saat proses pewarnaan gram, zat pewarna yang ditetaskan terlalu banyak sehingga zat pewarna yang terserap oleh dinding sel bakteri terlalu banyak, hal ini yang menyebabkan hasil yang diperoleh menjadi warna kehitaman dan terlalu tebal. Selain itu, kurang tipisnya bakteri yang diletakkan diatas obyek glass, sehingga bakteri terlihat bertumpuk-tumpuk dan sulit diamati. Sedangkan menurut Fitria (2009), Sel bakteri gram positif mungkin akan tampak merah jika waktu dekolorisasi terlalu lama dan bakteri gram negatif akan tampak keunguan apabila waktu dekolorisasinya terlalu pendek. Akan tetapi bila dilihat dari susunannya, benar bahwa bakteri *S. aureus* hidup secara berkoloni dan berbentuk bulat seperti buah anggur.

4.1.2 Peremajaan Bakteri *S. aureus*

Pengujian viabilitas bakteri diawali dengan peremajaan bakteri yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Malang. Bakteri yang digunakan dalam kegiatan ini adalah bakteri *S. aureus* yaitu jenis bakteri gram positif yang berbentuk bulat dan hidup secara berkoloni. Langkah-langkah yang dilakukan dalam peremajaan bakteri adalah sebagai berikut: Bakteri *S. aureus* diremajakan didalam tabung reaksi yang berisi medium NA miring padat. Medium NA cair dimasukkan kedalam tabung reaksi kurang lebih 10 ml, kemudian miringkan tabung dan tunggu hingga medium memadat, setelah itu ambil 1 ose bakteri dan remajakan secara zig-zag pada medium NA miring padat, dan masukkan dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam.

4.1.3 Pembuatan Sampel Bakteri

Bakteri *S. aureus* yang telah diremajakan dan berumur 1 hari pada media NA miring, diambil 1 ose dan diinokulasi kedalam 100 ml media cair NB (Nutrient Broth). Media NB ini sebagai nutrisi bagi bakteri agar dapat tumbuh dan berkembang lagi. Setelah itu, media NB yang telah berisi bakteri dimasukkan dalam inkubator shaker dengan suhu 37 °C pada agitasi 120 rpm selama 24 jam. Bakteri yang dimasukkan dalam inkubator shaker ini bertujuan untuk mempercepat pertumbuhan bakteri sehingga hasilnya akan lebih banyak dibandingkan menggunakan inkubator biasa.

Bakteri yang telah berumur satu hari pada medium NB, dimasukkan kedalam tabung eppendorf sebanyak 10 ml. Kemudian disentrifuge dengan menggunakan suhu 4 °C kecepatan 5000 rpm dan waktu 10 menit. Hal ini bertujuan untuk memisahkan antara bakteri itu sendiri dengan media tumbuhnya. Suhu yang rendah digunakan untuk mempertahankan keadaan bakteri. Hasilnya sentrifuge berupa pelet yang mengendap dibawah yaitu bakteri *S. aureus* itu sendiri dan supernata yang berupa cairan NB. Supernata yang didapat dibuang, kemudian diberi cairan NaCl 0.9 % kurang lebih sebanyak 2-3 tetes. Cairan ini berfungsi untuk mencuci atau memersihkan sisa-sisa media yang masih melekat pada bakteri dan dinding tabung. Langkah selanjutnya adalah memvortex atau mencampur cairan NaCl 0.9 % agar tercampur merata. Setelah divortex, sentrifuge kembali dengan suhu, kecepatan dan waktu yang sama, agar cairan terpisah dengan pelet dan tetap mempertahankan keadaan bakteri, setelah itu buang supernatanya. Agar pencucian ini benar-benar bersih atau media

tumbuhnya sudah tidak melekat pada bakteri, maka ulangi langkah-langkah tersebut sebanyak 2-3 kali. Pastikan semua perlakuan yang dikerjakan dalam keadaan bersih dan steril atau dapat juga dilakukan didekat api bunsen.

Pelet yang telah dicuci bersih diencerkan dengan menambah cairan NaCl 0.9 % yang telah steril sebanyak 3-5 ml atau hingga jumlah sel 3×10^8 sel/ml. Ada banyak cara untuk memperkirakan populasi mikroba pada kultur tersuspensi. Salah satu cara yang paling mudah yaitu melalui perbandingan secara visual dengan standar yang telah diketahui dengan menggunakan standar Mc Farland.

Mc Farland adalah penyetaraan konsentrasi mikroba dengan menggunakan larutan BaCl_2 1 % dan H_2SO_4 1 %. Standar kekeruhan Mc Farland ini dimaksudkan untuk menggantikan perhitungan bakteri satu per satu dan untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan pada prosedur pengujian antimikroba. Mc Farland biasa digunakan untuk menghitung bakteri dengan metode spektrofotometri. Keuntungan dari penggunaan standar Mc Farland adalah tidak dibutuhkannya waktu inkubasi yang cukup untuk memperoleh jumlah kepadatan bakteri yang diinginkan. Sedangkan kerugiannya, akan terjadi perbedaan pandangan untuk menilai tingkat kekeruhan dari sel bakteri (Safitri, 2014).

Penelitian ini menggunakan larutan Mc Farland skala 1 atau setara dengan 3×10^8 sel/ml. Ketika pelet yang diencerkan dengan NaCl telah menyerupai kekeruhannya dengan larutan Mc Farland skala 1 secara visual maka sampel inilah yang akan diberi perlakuan dengan merubah keadaan lingkungannya yaitu suhu.

4.1.4 Perlakuan

Pemberian perlakuan dengan cara diinkubasi dalam inkubator, diberi pemanasan dengan variasi suhu yaitu sebesar 40 °C, 45 °C, dan 50 °C, serta variasi waktu yang sama yaitu 10 menit, 20 menit dan 30 menit. Sumber panas berasal dari inkubator. Inkubator merupakan alat yang berfungsi untuk memamer mikroba dengan suhu dan kelembaban tertentu. Prinsip kerjanya yaitu mengubah energi listrik menjadi energi panas. Kawat nikelin akan menghambat aliran elektron yang mengalir sehingga mengakibatkan peningkatan suhu kawat. Panas yang dihasilkan oleh kawat dipancarkan kesegala arah didalam inkubator. Ketika sampel dimasukkan, akan terjadi perpindahan panas dari lingkungan (inkubator) ke sistem (sampel bakteri) tanpa perantara. Perpindahan panas ini disebut dengan radiasi (Serway, 2000).

Kalor merupakan bentuk energi yang tidak dapat dimusnahkan tetapi dapat berubah dari satu bentuk ke bentuk yang lain. Berdasarkan hukum kekekalan energi maka energi listrik dapat dirubah menjadi energi kalor ataupun sebaliknya. Besarnya energi listrik yang diubah atau diserap sama dengan kalor yang dihasilkan. Dalam matematis dapat dirumuskan (Serway, 2000):

$$W = Q \dots\dots\dots(4.1)$$

Keterangan: W = Energi Listrik (Joule)

Q = Kalor (Joule)

4.1.5 Penentuan Viabilitas bakteri *S. aureus*

Kultur bakteri yang telah diberi perlakuan dengan pemanasan, kemudian diencerkan sampai pengenceran 10^{-7} . Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk

mempermudah dalam penghitungan koloni bakteri. Setelah proses pengenceran maka diambil sebanyak 1000 μl dan dituangkan dalam cawan petri steril kemudian tuangkan media NA cair kira-kira sebanyak 15 ml. Setelah itu, dihomogenkan dengan membentuk angka delapan, dan tunggu hingga media memadat. Semua proses yang dilakukan usahakan aseptis yaitu didekat api bunsen agar tidak mudah terkontaminasi. Setelah media NA memadat, masukkan cawan petri kedalam inkubator dengan posisi yang terbalik (bagian tutup berada dibawah). Inkubasi bakteri pada suhu normal atau 37 °C selama 24 jam. Setelah berumur satu hari, maka bakteri akan tumbuh yang membentuk suatu koloni. Apabila dilihat secara visual maka akan terlihat titik-titik putih berwarna agak keruh (gambar 4.2). Koloni-koloni itulah yang akan dihitung menggunakan coloni counter. Sehingga akan didapatkan hasil seperti pada tabel 4.1.



Gambar 4.2 Koloni Bakteri *S. aureus* Pada Medium NA Padat

Bakteri yang telah dihitung diberi tanda dengan spidol untuk menghindari perhitungan ulang.

4.1.6 Karakterisasi Protein Menggunakan SDS PAGE

Elektroforesis merupakan suatu teknik pemisahan komponen/molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik.

Banyak molekul biologi bermuatan listrik yang besarnya tergantung pada pH dan komposisi medium dimana molekul biologi tersebut terlarut. Bila berada dalam suatu medan listrik, molekul biologi yang bermuatan negatif akan bermigrasi ke elektroda positif dan sebaliknya. Prinsip inilah yang dipakai dalam elektroforesis untuk memisahkan molekul-molekul berdasarkan muatannya. Dalam hal ini protein diberi muatan negatif (Westermeier, 2004).

SDS (*Sodium Dodecyl Sulfat*) merupakan detergen yang dapat memecah molekul hidrofobik tetapi juga memiliki muatan negatif. Jika suatu sel diinkubasi dengan SDS maka membran sel akan dihancurkan dan seluruh protein akan dilindungi dengan banyak muatan negatif (Davidson, 2001). Sedangkan PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) merupakan suatu teknik analisis yang digunakan untuk separasi dan karakterisasi protein. Solution dari acrylamide dan bisacrylamide merupakan polymerisasi. Bisacrylamid dimasukkan secara crosslink diantara rantai polyacrilamid. Ukuran porinya ditentukan berdasarkan rasio dan konsentrasi keduanya. Polimerisasi dari acrylamid dan monomer bisacrylamid merupakan induksi oleh ammonium persulfat (APS) (Williams, 2001).

Jika molekul yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, kemudian dialiri arus listrik dari suatu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif. Kecepatan gerak molekul tersebut tergantung pada nisbah muatan terhadap massanya serta tergantung pula pada bentuk molekulnya (Yuwono, 2005). Pergerakan ini dapat dijelaskan dengan gaya Lorentz, yang terkait dengan

sifat-sifat dasar listrik bahan yang diamati dan kondisi listrik lingkungan (Fatchiyah, 2006):

$$F = qE \dots\dots\dots (4.2)$$

F adalah gaya Lorentz, q adalah muatan yang dibawa oleh objek, E adalah medan listrik.

Sampel protein dimasukkan ke dalam slot atau sumuran pada ujung agar. Karena sampel ini memiliki muatan (dari SDS) juga memiliki berat (dari RSB), maka Partikel yang bermuatan negatif akan menuju anoda (+) ketika berada pada medan listrik dan mereka akan turun ke dasar sumuran. Untuk memisahkan protein secara akurat berdasarkan ukurannya, akan sangat penting jika kita mendenaturasi protein sebelum mengisikannya dalam gel, juga harus memanaskan beberapa sampel hingga 95 °C untuk membantu mendenaturasi protein secara sempurna, sehingga menghasilkan molekul linier yang akan bermigrasi berdasarkan bobot molekulnya (Fatchiyah, 2006).

Langkah awal yang dilakukan sebelum sampel dimasukkan pada gel elektroforesis adalah isolasi protein. Kultur hasil pemanasan dengan variasi suhu dan waktu yang berbeda disentrifuge pada suhu 4 °C selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm untuk memisahkan supernata dengan peletnya. Pelet yang dihasilkan ditambah dengan sample buffer 1000 µl yang berfungsi sebagai penyangga dan dimasukkan dalam tabung eppendorf kemudian divorteks, setelah itu disonikasi selama 5 menit dengan amplitudo 40% pada suhu rendah untuk memecah atau merusak dinding sel dari bakteri sehingga didapatkan protein yang diinginkan. Sampel lalu sentrifuge selama 20 menit dengan kecepatan 10.000

rpm. Diambil supernatnya karena dalam supernata mengandung protein dari bakteri dan ditambah PMSF yang berfungsi untuk mempertahankan struktur dan fungsi protein supaya tidak rusak. Selanjutnya divortek hingga homogen. Diambil sebanyak 20 µl supernata yang telah ditambah PMSF kemudian ditambah dengan 20 µl RSB yang berfungsi sebagai pemberat agar ketika proses running molekul protein dapat terpisah sesuai berat molekulnya, dan dididihkan selama ± 5 menit di air yang mendidih untuk mengoptimalkan denaturasi protein.

Sampel yang telah dididihkan, diambil sebanyak 30 µl dan dimasukkan ke dalam kolom gel yang telah dibuat dengan hati-hati. Larutan buffer (berfungsi untuk menjaga kondisi fisiologis dari protein dan gel agar tetap berluatan negatif) dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis sesuai batas yang telah ditentukan, Kemudian dielektroforesis selama ± 45 menit pada 200 Volt. Setelah running mencapai batas yang diinginkan, gel diangkat lalu diwarnai dengan *coomassie brilliant blue staining gel* warna biru *Coomassie R-250*, selama ± 18 jam. Kemudian gel dicuci dengan larutan *destain solution coomassie R-250*, selama ± 1 hari. Selanjutnya hasil pencucian discan.

4.2 Hasil Penelitian

4.2.1 Data Hasil Penelitian

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dengan memberikan pengaruh suhu dan waktu terhadap pertumbuhan bakteri, didapat data hasil penghitungan jumlah koloni bakteri yang dihitung menggunakan coloni counter. Untuk mengetahui jumlah koloni bakteri *S.aureus* dapat dihitung menggunakan persamaan :

$$\sum sel/ml = \sum koloni \times \frac{1}{fp} \times CFU/ml \dots\dots\dots (4.3)$$

Keterangan: *fp* : Jumlah pengenceran yang dilakukan

Dari persamaan diatas diperoleh data koloni seperti pada tabel 4.1:

Tabel 4.1 Data Hasil Rata-Rata Uji Viabilitas Bakteri *S. aureus* Setelah Diberi Pengaruh Suhu dan Waktu

Suhu (°C)	Jumlah Bakteri (CFU/ml)			
	10 menit	20 menit	30 menit	Kontrol
40	72,33.10 ⁷	52,67.10 ⁷	35,67.10 ⁷	137,67.10 ⁷
45	62,67.10 ⁷	45,33.10 ⁷	30,00.10 ⁷	
50	51,00.10 ⁷	31,67.10 ⁷	24,00.10 ⁷	

Berdasarkan tabel 4.1 diatas, diketahui bahwa suhu dapat menurunkan jumlah bakteri. Jumlah rata-rata bakteri sebelum diberi perlakuan adalah 137,67.10⁷ CFU/ml. Pada suhu 40 °C dan waktu 10 menit, jumlah rata-rata bakteri yang hidup mencapai 72,33.10⁷ CFU/ml. Sedangkan pada suhu yang sama dengan waktu yang lebih lama 20 menit jumlah rata-rata bakteri menurun menjadi 52,67.10⁷ CFU/ml. Untuk lama waktu 30 menit dan suhu 40 °C, jumlah rata-rata bakteri menjadi 35,67.10⁷ CFU/ml. Apabila dilihat dari waktu yang sama misalnya 10 menit dari tabel 4.1 , dengan suhu berbeda yaitu 40 °C, 45 °C, dan 50 °C, jumlah rata-rata bakteri yang hidup turun dari 72,33.10⁷ CFU/ml; 62,67.10⁷ CFU/ml; menjadi 51,00.10⁷ CFU/ml. Hal ini berarti suhu dan lama waktu pemanasan sangat berpengaruh terhadap viabilitas bakteri. Pertumbuhan bakteri semakin menurun seiring dengan meningkatnya suhu lingkungan bakteri dan lamanya pemanasan.

4.2.2 Viabilitas Bakteri *S.aureus*

Berdasarkan data hasil penelitian dengan variasi suhu yaitu 40 °C, 45 °C, dan 50 °C, serta variasi waktu 10 menit, 20 menit dan 30 menit dapat dicari persentase viabilitas bakteri dengan menggunakan persamaan (Tuasikal, 2006):

$$\%viabilitas = \frac{\text{jumlah koloni bakteri hidup setelah radiasi}}{\text{jumlah koloni bakteri hidup tanpa radiasi}} \times 100\% \dots\dots\dots (4.4)$$

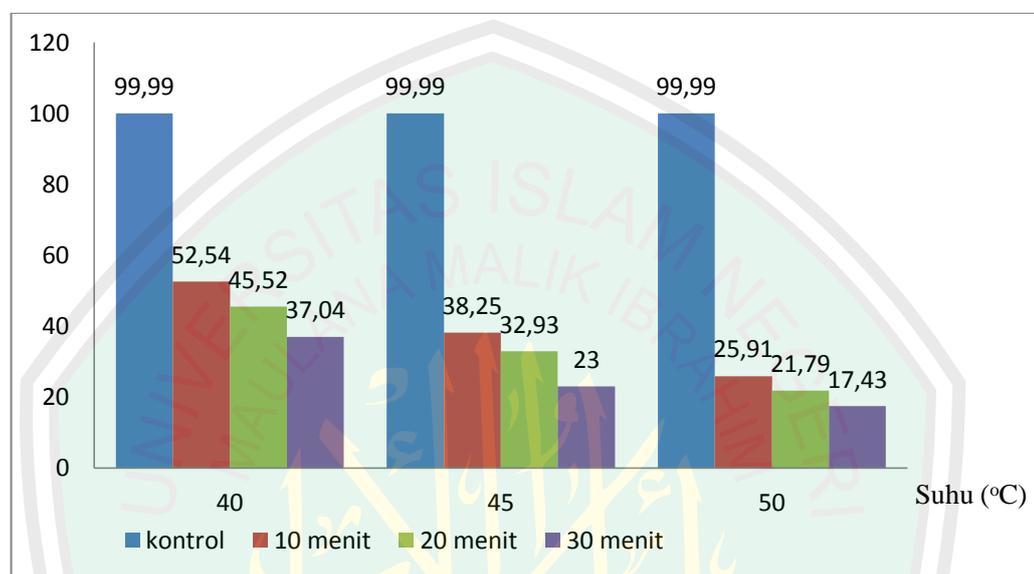
Sehingga diperoleh persentase viabilitas seperti pada tabel 4.2:

Tabel 4.2 Data Persentase Viabilitas Bakteri *S. aureus* Setelah Diberi Pengaruh Suhu dan Waktu

Suhu (°C)	Waktu (menit)	% Viabilitas
Kontrol	0	99,99
40	10	52,54
	20	38,25
	30	25,91
45	10	45,52
	20	32,93
	30	21,79
50	10	37,04
	20	23,00
	30	17,43

Berdasarkan persentase viabilitas pada tabel 4.2 menunjukkan bahwa terjadi penurunan tingkat viabilitas atau kemampuan bakteri dapat bertahan hidup yang di tandai dengan penurunan jumlah bakteri *S. aureus*. Pada suhu 40 °C dan waktu 10 menit persentase viabilitasnya mencapai 52,54 %. Suhu 45 °C dan waktu 20 menit viabilitasnya mencapai 32,93 %. Dan ketika suhu lingkungannya ditinggikan 50 °C dengan waktu 30 menit persentase viabilitasnya juga menurun sebesar 17,43 %. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar suhu lingkungan dan

waktu pemanasannya maka semakin menurun persentase viabilitas bakteri *S. aureus*. Dari tabel 4.2, diperoleh hubungan antara suhu dengan viabilitas, dan waktu dengan viabilitas yang ditunjukkan pada gambar 4.3:



Gambar 4.3 Grafik Hubungan Antara Persentase Viabilitas dengan Suhu dan Waktu

Gambar 4.3 dapat dilihat bahwa terjadi penurunan tingkat viabilitas bakteri *S. aureus* seiring dengan bertambahnya suhu dan waktu. Penurunan viabilitas bakteri hingga mencapai 48 % pada perlakuan 1 (40 °C, 10 menit) jika dibandingkan dengan kontrol yang menggunakan suhu optimal dalam pertumbuhan bakteri (37 °C) dan sekitar 52 % bakteri yang bertahan hidup ketika suhu dinaikkan. Hal ini dikarenakan perubahan lingkungan berupa suhu dapat merusak membran sel bakteri. Ketika membran sel rusak maka akan terjadi denaturasi protein dan menurunnya aktifitas didalam sel, sehingga sel akan mati. Jadi suhu dan waktu sangat berpengaruh terhadap viabilitas bakteri.

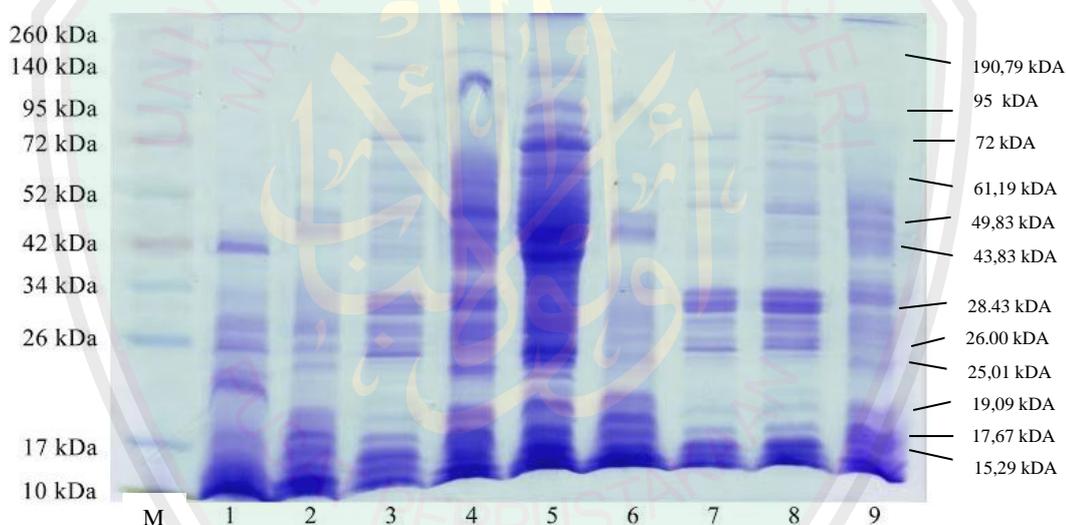
Selanjutnya data viabilitas bakteri *S. aureus* yang telah didapat, dianalisa menggunakan *univariate analysis of variance* (Anova) two-way untuk mengetahui pengaruh suhu dan waktu terhadap penurunan jumlah bakteri serta suhu dan waktu yang paling banyak dalam melemahkan/mematikan bakteri. Sebelum melakukan uji Anova terlebih dahulu melakukan uji normalitas untuk mengetahui data yang telah didapat terdistribusi normal atau tidak.

SPSS menyajikan dua tabel sekaligus dalam uji normalitas, Kolmogorov-Smirnov dan Shapiro-Wilk. Karena data/subyek yang diperoleh kurang dari 50, maka uji Shapiro-Wilk dianggap lebih akurat. Dari hasil uji normalitas antara viabilitas dengan pengaruh suhu dan waktu menghasilkan nilai signifikansi yang semua nilainya $p > 0,05$, maka H_0 diterima. Artinya data yang diperoleh terdistribusi normal.

Setelah diketahui bahwa data yang diperoleh terdistribusi normal maka selanjutnya dianalisa menggunakan *univariate analysis of variance* (Anova) two-way untuk mengetahui apakah ada pengaruh antara suhu dan waktu terhadap viabilitas bakteri. Hasil dari Anova menjelaskan bahwa suhu dan waktu berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri. Karena nilai Signifikansi pada variasi suhu dan waktu adalah $p = 0,000$, dan nilai ini lebih kecil dari $0,050$ ($p < 0,050$), hal ini berarti bahwa H_0 ditolak, artinya suhu dan waktu berpengaruh terhadap viabilitas bakteri. Hanya sebagian kecil bakteri yang dapat mempertahankan hidupnya setelah suhu lingkungannya dirubah, walaupun dalam waktu yang tidak terlalu lama, akan tetapi efek yang terjadi sangatlah besar.

4.2.3 Profil Protein Bakteri *S. aureus*

Hasil elektroforesis SDS-PAGE protein bakteri *S. aureus*, sebagaimana tampak pada gambar 4.4 menunjukkan terjadinya peningkatan ataupun penurunan ekspresi protein pada berat molekul tertentu dengan perlakuan yang berbeda. Protein dari bakteri *S. aureus* yang telah diberi perlakuan dengan variasi suhu yaitu 40 °C, 45 °C, dan 50 °C, serta variasi waktu 10 menit, 20 menit dan 30 menit, memiliki jumlah pita protein yang berbeda-beda dengan berat molekul berkisar antara 10 kDa – 220 kDa.



Gambar 4.4 Profil Protein Bakteri *S. aureus* Hasil Pemanasan dengan Variasi Suhu dan Waktu (Elektroforesis SDS-PAGE). M (Marker/Standart Protein), 1 (40 40 °C, 10 menit), 2 (40 °C,20 menit), 3 (40 °C, 30 menit), 4 (45 °C, 10 menit), 5 (45 °C, 20 menit), 6 (45 °C, 30 menit), 7 (50 °C, 10 menit), 8 (50 °C, 20 menit), 9 (50 °C, 30 menit).

Pada gambar 4.4 terlihat bahwa terjadi peningkatan ekspresi protein seiring dengan meningkatnya suhu, dan yang paling terekspresi adalah pada perlakuan 5 yaitu suhu 45 °C dan waktu 20 menit, dimana banyak terjadi penebalan pada pita protein tertentu dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Hal ini dimungkinkan

terjadi peningkatan produksi protein ketika bakteri diberi suhu yang lebih tinggi dan waktu yang lama sebagai upaya pertahanan bakteri, sehingga lebih banyak yang terekspresi. Sedangkan untuk perlakuan 6, 7, 8, 9 terjadi penurunan tingkat ketebalan pita kembali pada berat molekul tertentu. Hal ini dimungkinkan karena telah menurunnya tingkat hidup bakteri sehingga produksi protein berkurang dan adanya degradasi protein sehingga ikatan antar protein menjadi putus dan rusak.

Tabel 4.3 Ekspresi Pita Protein Hasil Pemanasan dengan Variasi Suhu dan Waktu

Berat molekul (kDa)	Perlakuan								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
15,29	v	v	v	v	v	v	v	x	x
17,67	x	v	v	v	v	v	x	v	v
19,09	x	v	x	v	v	v	x	v	x
20,62	x	x	x	x	v	v	x	v	x
23,16	x	x	x	v	v	x	x	x	v
25,01	x	v	v	v	v	x	v	v	x
26	x	x	v	v	v	x	v	v	v
28,43	x	v	v	v	v	x	v	v	x
29,73	x	x	v	x	v	x	v	v	x
31,09	x	x	v	v	x	x	v	x	v
32,51	x	x	v	v	v	x	x	v	x
43,83	v	v	x	v	v	v	x	x	x
47,74	x	x	x	x	v	v	x	v	x
49,83	x	v	v	v	x	x	v	x	v
61,19	x	x	v	v	v	x	x	v	x
72	x	x	x	x	v	x	v	v	x
95	x	x	x	x	v	x	x	x	x
140	x	x	v	x	v	x	v	v	x
190,79	x	x	x	v	x	x	x	x	x

Keterangan: v : Protein terekspresi

x : Protein tidak terekspresi

Tabel 4.3 menjelaskan gambaran diskriptif protein yang terekspresi pada berat molekul antara 15 kDa – 190 kDa. Dan yang paling banyak terekspresi

untuk setiap perlakuan adalah protein dengan berat molekul 15.29 kDa dan 17.67 kDa. Protein dengan berat molekul 15.29 kDa terekspresi pada perlakuan 1-7 sedangkan pada perlakuan 8 dan 9 tidak terekspresi. Untuk protein dengan berat molekul 17.67 kDa terekspresi pada semua perlakuan kecuali perlakuan 1 dan 7. Protein dengan berat molekul yang tinggi yaitu 190.79 kDa hanya terekspresi pada perlakuan 4 yaitu perlakuan dengan suhu 45 °C dan waktu 10 menit.

Tabel 4.4 Ekspresi Pita Protein (Tebal dan Tipis) Hasil SDS PAGE

Berat molekul (kDa)	Perlakuan								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
15,29	→	→	→	↑	↑	→	↑	x	x
17,67	x	→	→	↑	↑	↓	x	↑	→
19,09	x	→	x	↑	↑	↓	x	→	x
20,62	x	x	x	x	↑	↑	x	↓	x
23,16	x	x	x	→	↑	x	x	x	↓
25,01	x	→	↑	→	↑	x	→	↓	x
26	x	x	→	↑	↑	x	→	→	↓
28,43	x	→	↑	↑	↑	x	→	↑	x
29,73	x	x	→	x	↑	x	↓	↓	x
31,09	x	x	→	→	↑	x	↓	x	→
32,51	x	x	→	→	↑	x	x	↓	x
43,83	→	↓	x	→	↑	↓	x	x	x
47,74	x	x	x	x	↑	↓	x	↓	x
49,83	x	→	↑	↓	↑	x	↓	x	↑
61,19	x	x	→	↑	↑	x	x	↓	x
72	x	x	x	x	↑	x	↓	↓	x
95	x	x	x	x	↑	x	x	x	x
140	x	x	→	x	↑	x	↓	↑	x
190,79	x	x	x	→	x	x	x	x	x

Keterangan : ↑ : Kenaikan tingkat ketebalan protein
 ↓ : Penurunan tingkat ketebalan protein
 → : Ketebalan protein sama
 x : Tidak ada protein yang terlihat

Tabel 4.4 menunjukkan tingkat ekspresi protein menurut densitasnya yang dianalisa secara diskriptif menurut tebal dan tipisnya pita protein. Terjadi kenaikan densitas protein yang bedar pada perlakuan 4 dan 5. Dan ada pula protein yang tadinya terekspresi tebal kemudian tidak terekspresi lagi pada perlakuan selanjutnya. Seperti pada protein dengan berat molekul 20.62 kDa, menunjukkan kenaikan tingkat ekspresi pada perlakuan 5 dan 6, dan tidak ada protein yang terlihat pada perlakuan 7 dan kembali terekspresi pada perlakuan 8 tetapi lebih menipis daripada ekspresi sebelumnya. Hal ini menunjukkan bahwa keadaan lingkungan bakteri berpengaruh terhadap ekspresi protein bakteri.

4.3 Pembahasan

4.3.1 Pengaruh Suhu dan Waktu Terhadap Viabilitas Bakteri

Mikroba dapat tumbuh dimana-mana tetapi tetap dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan. Suhu merupakan salah satu faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba. Mikroorganisme dapat dikendalikan (dibasmi, dihambat, atau ditiadakan) dari suatu lingkungan, dengan menggunakan berbagai proses atau sarana fisik. Dalam kegiatan ini dapat dilihat pengaruh dari faktor lingkungan yaitu suhu terhadap pertumbuhan bakteri. Viabilitas ini dapat diketahui dengan menumbuhkan bakteri pada media dengan berbagai perlakuan. Pertumbuhan bakteri bergantung pada reaksi-reaksi kimiawi dan arena laju reaksi-reaksi tersebut dipengaruhi oleh suhu maka pertumbuhan bakteri sangat dipengaruhi oleh suhu (Pleczar, 2007).

Viabilitas bakteri *S. aureus* ditumbuhkan pada sebuah media NA (Nutrient Agar) setelah diberi perlakuan suhu yaitu 40 °C, 45 °C dan 50 °C dengan lama

pemanasan 10 menit, 20 menit dan 30 menit. Suhu yang digunakan sebagai media tumbuhnya adalah suhu normal pertumbuhan bakteri yaitu 37 °C. Yang harus diperhatikan dalam pelemahan bakteri menggunakan panas adalah suatu bagian dari organisme yang mengalami perubahan senyawa kimia dalam setiap unit waktu dan salah satu dari perubahan itu cukup untuk menginaktivasi suatu organisme. Waktu yang dibutuhkan untuk melemahkan bakteri umumnya berhubungan dengan temperatur paparan. Hubungan ini dapat menggambarkan apa yang disebut waktu kematian thermal. Waktu ini mengacu pada periode waktu terpendek yang dibutuhkan untuk mematikan suatu suspensi bakteri pada suatu suhu tertentu. Ada lagi istilah waktu pengurangan desimal yang mengacu pada pengurangan khusus dalam hal jumlah sel hidup, yaitu lamanya waktu dalam menit untuk mengurangi populasi sebesar 90% (Pelczar, 2012).

Viabilitas yang terlihat pada tabel 4.1 menjelaskan bahwa terjadi penurunan rata-rata tingkat pertumbuhan bakteri *S. aureus* seiring dengan bertambah tingginya suhu dan waktu yang diberikan jika dibandingkan dengan kontrol. Viabilitas berarti kelangsungan hidup, aktivitas hidup atau kemungkinan hidup yang ditunjukkan dengan pertumbuhannya (pada bakteri) (Winarwi, 2006). Semakin tinggi suhu yang diberikan maka semakin kecil pula aktivitas hidup atau kemungkinan hidup dari bakteri tersebut. Hal ini dikarenakan suhu yang diberikan dapat mempengaruhi mikroorganisme dalam dua cara yang berlawanan yaitu: 1) Apabila suhu naik, kecepatan mikroorganisme naik dan pertumbuhan dipercepat. Sebaliknya apabila suhu turun, kecepatan metabolisme juga turun dan pertumbuhan diperlambat 2) Apabila suhu naik atau turun, tingkat pertumbuhan

mungkin terhenti, komponen sel menjadi tidak aktif dan sel-sel dapat mati (Winarwi, 2006).

Sel kebanyakan bakteri akan dimatikan dalam waktu 5-10 menit pada suhu 60 °C sampai 70 °C dengan panas lembab (Pelczar, 2012). Bakteri *S. aureus* sendiri dapat tumbuh pada suhu 15-45 °C dan dalam NaCl berkonsentrasi 15 %. Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37 °C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar 20 – 25 °C (Jewetz *et al.*,2008).

Dilihat dari persentase viabilitas terjadi penurunan tingkat hidup bakteri *S. aureus* mencapai 83 % yakni hanya sekitar 17,43 % bakteri yang masih bertahan hidup ketika suhu lingkungannya dinaikkan menjadi 50 °C dan lama pemanasannya 30 menit. Hal ini membuktikan bahwa bakteri akan sulit mempertahankan hidupnya apabila suhunya tinggi.

Panas merupakan energi yang bergerak akibat perbedaan suhu. Panas bergerak dari daerah bersuhu tinggi ke daerah bersuhu rendah. Ketika dua benda dengan suhu yang berbeda bergandengan, yang dalam hal ini inkubasi sebagai sumber panas dan sampel bakteri sebagai obyek penelitian yang kemudian dimasukkan dalam inkubasi/sistem, maka akan terjadi pertukaran energi internal sampai suhu keduanya seimbang. Jumlah energi yang disalurkan merupakan jumlah energi yang tertukar. Ketika suatu benda melepas panas ke sekitarnya ($Q < 0$), maka akan ada interaksi benda lain menyerap panas dari sekitarnya ($Q > 0$). Pernyataan ini dikenal dengan Asas Black, dimana besar kalor yang dilepaskan oleh suatu benda sama dengan besarnya kalor yang diterima benda lain (Serway, 2000):

$$Q_{lepas} = Q_{terima} \dots\dots\dots (4.5)$$

Setiap benda memiliki energi dalam yang berhubungan dengan gerak acak dari atom-atom atau molekul penyusunnya. Energi dalam ini berbanding lurus terhadap suhu benda. Ketika suhu lingkungan pertumbuhan bakteri dinaikkan maka energi dalam yang diserap bakteri juga naik. Hal ini dikarenakan gerakan molekul-molekul penyusun membran sel akan mengalami pergerakan yang cepat dan semakin cepat seiring dengan bertambahnya suhu lingkungan. Gesekan antar molekul akibat pergerakan molekul yang cepat, dapat meningkatkan suhu didalam sel sehingga membran sel akan mengalami kerusakan.

Kerusakan membran sel ini menimbulkan denaturasi protein. Denaturasi akibat panas menyebabkan molekul-molekul yang menyusun protein bergerak sangat cepat. Sehingga sifat protein yang hidrofobik menjadi terbuka. Akibatnya, semakin panas suhu lingkungannya molekul protein akan semakin cepat bergerak dan dapat memutuskan ikatan hidrogen didalamnya. Ketika fungsi biokimia protein terganggu maka segala aktifitas sel juga akan terganggu (Vladimir, 2007).

Panas dapat mengacaukan ikatan hidrogen protein namun tidak akan mengganggu ikatan kovalennya. Hal ini dikarenakan dengan meningkatnya suhu akan membuat energi kinetik molekul bertambah. Bertambahnya energi kinetik akan mengacaukan ikatan-ikatan hidrogen. Dengan naiknya suhu, akan membuat perubahan entalpi sistem naik. Selain itu bentuk protein yang terdenaturasi dan tidak teratur juga sebagai tanda bahwa entropi bertambah. Entropi sendiri merupakan derajat ketidakteraturan, semakin tidak teratur maka entropi akan bertambah. Pemanasan juga dapat mengakibatkan kemampuan protein untuk

mengikat air menjadi menurun dan dapat menyebabkan koagulasi protein (Kumalasari, 2012).

Denaturasi protein juga tidak mempengaruhi kandungan struktur utama protein yaitu C, H, O dan N. Meskipun beberapa protein mengalami kemungkinan untuk kehilangan kandungan senyawa mereka saat denaturasi, namun kebanyakan protein tidak akan mengalami kondisi tersebut, hanya saja tidak menutup kemungkinan protein akan merubah struktur kecil didalamnya saat denaturasi terjadi (Stoker, 2010). Dengan kata lain denaturasi terjadi karena kerusakan struktur sekunder, tersier, dan kuartener, tetapi struktur primer (ikatan peptida) masih utuh (Simanjuntak, 2003).

Panas juga dapat menghilangkan kekuatan fungsional membran, membocorkan molekul kecil dan pengabsorpsi materi. Materi tersebut berasal dari degradasi ribosom oleh ribonuklease yang teraktivasi karena perlakuan panas. Dari keadaan tersebut, dapat dilihat adanya hubungan antara degradasi RNA ribosomal dengan hilangnya viabilitas sel karena temperatur tinggi (Stoker, 2010).

Pada penelitian ini, penurunan tingkat pertumbuhan bakteri yang diharapkan, tetapi dicari bakteri yang masih berpotensi sebagai bahan vaksin dengan melihat profil protein nya. Prinsip penting dalam pembuatan vaksin adalah metode dalam inaktivasi/pelemahan harus dapat memusnahkan inefektivitas dari organisme, tetapi sifat antigeniknya harus tidak berubah. Vaksin dapat diperoleh dengan cara konvensional, baik secara kimia maupun pemanasan. Vaksin konvensional yang umum digunakan adalah dengan menginaktivasi sel bakteri melalui pemanasan.

Vaksin adalah bahan antigenik yang digunakan untuk menghasilkan kekebalan aktif terhadap suatu penyakit, dan salah satu vaksin penghasil antibodi yaitu protein yang berperan untuk melawan bakteri yang biasa disebut antigen. Antigen merupakan suatu suspensi yang apabila memasuki inang vertebrata menimbulkan respon kekebalan yang membawa kepada terbentuknya kekebalan. Respon kekebalan ini mengakibatkan pembentukan antibodi spesifik yang beredar di dalam aliran darah (*imunitas humoral*) atau merangsang peningkatan jumlah sel-sel reaktif khusus yang disebut limfosit (*imunitas yang diperantarai sel*). Baik antibodi maupun limfosit khusus akan bereaksi dengan antigen yang digunakan sebagai bahan untuk membentuk kekebalan. Antigen adalah substansi yang mempunyai berat molekul tinggi. Suatu senyawa dengan berat molekul kurang dari 6.000 dalton jarang sekali dapat bekerja sendiri sebagai antigen. Kebanyakan antigen memiliki berat molekul 10.000 dalton atau lebih (Pelczar, 2012).

Terdapat dua kelompok senyawa alamiah yang jelas bersifat imunogenik, artinya mempunyai kemampuan untuk merangsang respon kekebalan. Senyawa tersebut adalah protein dan polisakaride. Protein pada umumnya lebih efektif dalam merangsang pembentukan antibodi dibandingkan polisakaride. Protein berasal dari kata proteos (utama atau pertama) merupakan senyawa makromolekul yang memiliki peranan penting pada setiap makhluk hidup. Protein adalah suatu polipeptida dengan bobot molekul yang sangat bervariasi, dari 5.000 hingga lebih dari satu juta. Protein memiliki beberapa fungsi, diantaranya sebagai enzim, zat pengatur pergerakan, pertahanan tubuh, alat pengangkut dan lain-lain tergantung sepenuhnya pada struktur 3-dimensional protein tersebut (Berg, 2002). Protein

yang berpotensi sebagai antigen memiliki berat molekul 10.000 dalton atau lebih. Dan untuk mengetahui protein yang berpotensi sebagai bahan vaksin dapat dilakukan dengan pengujian menggunakan suatu metode yang disebut elektroforesis.

4.3.2 Pengaruh Suhu dan Waktu Terhadap Profil Protein Bakteri

Suhu dan lamanya pemanasan tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap profil protein bakteri *S. aureus*. Hal ini ditunjukkan oleh analisa diskriptif densitas protein dengan melihat tebal tipis nya pita protein. Karena terdapat protein yang memiliki berat molekul tertentu mengalami kenaikan ekspresi menjadi lebih tebal pada satu perlakuan, tetapi pada perlakuan selanjutnya protein tersebut tidak terekspresi, dan terekspresi kembali pada perlakuan yang lebih besar suhu dan waktunya. Ada pula pita protein yang terekspresi hampir disemua perlakuan tetapi tidak ada pengaruh yang nyata antara perlakuan terhadap hasil pita protein.

Terdapat peningkatan jumlah ekspresi protein dan kemudian terjadi penurunan kembali pada setiap perlakuan. Ekspresi yang tinggi terlihat pada perlakuan dengan suhu 45 °C dan suhu 20 menit. Selain itu, terjadi penebalan pita protein pada berat molekul 43,83 kDa dibanding dengan pengaruh suhu dan waktu lainnya. Tetapi berat molekul ini tidak terekspresi pada perlakuan 2 (40 °C, 20 menit), 7 (50 °C, 10 menit), dan 8 (50 °C, 20 menit). Menurut Hemavathy (2013), terjadi peningkatan ekspresi protein yang menonjol pada suhu 40 °C. Peningkatan ekspresi protein pada suhu yang lebih tinggi tampaknya mendapat respon langsung terhadap kelangsungan hidup dan mekanisme perlindungan bakteri

dengan memproduksi protein sebanyak mungkin untuk memastikan pertumbuhan sel bakteri.

Ekspresi protein yang meningkat kemungkinan juga berkaitan dengan vaktor virulensi. Bakteri memiliki sensor tertentu yang dapat merespon rangsangan dari lingkungan baru mereka, yang memungkinkan bakteri untuk mengekspresikan faktor virulensi jika diperlukan (Gross R, 1989). Selain itu proses denaturasi protein juga berperan penting dalam meningkatnya ekspresi protein. Menurut Winarno (2002), protein yang terdenaturasi mengalami dua kemungkinan, yaitu pembukaan rantai peptida dan pemecahan protein menjadi unit yang lebih kecil.

Efektifitas antigen yang digunakan dalam pembuatan vaksin ditentukan oleh spesifitas epitop-epitop yang hanya dikenali oleh suatu antibodi bagi setiap jenis antigen yang ditentukan, sehingga akan mensinyalir respon imunitas humoral yang tinggi bila diberikan (Ikmalia, 2008). Dengan demikian, penggunaan suhu dan waktu pemanasan yang tidak terlalu tinggi cukup efektif melemahkan bakteri tanpa harus menghilangkan kemampuan antigennya, karena secara keseluruhan jumlah protein yang dihasilkan tidak mengalami perubahan yang signifikan.

4.3.3 Vaksinasi Sebagai Tindakan Pencegahan Penyakit dalam Islam

Bakteri merupakan makhluk hidup makroskopis yang keberadaan dijelaskan secara tersirat dalam Q.S al-baqarah (2): 26, Allah SWT berfirman:

﴿إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةٌ فَمَا فَوْقَهَا.....﴾

“Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu” (Q.S al-baqarah (2): 26).

Kata مَا pada ayat diatas menunjukkan sesuatu yang kecil atau sedikit (Tafsir Ibnu Katsir, 2007). Dalam ayat tersebut Allah SWT membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Maksud ayat diatas adalah apa yang lebih kecil dari pada nyamuk baik dilihat dari segi makna maupun secara fisiknya, mengingat nyamuk adalah binatang yang kecil. Adapun hewan yang lebih rendah (lebih kecil) dari nyamuk adalah bakteri. Terdapat berbagai macam jenis bakteri yang diciptakan oleh Allah SWT. Salah satunya adalah bakteri *S. aureus* yang merupakan bakteri patogen pada manusia dan hewan. Bakteri ini dapat menimbulkan penyakit infeksi bahkan kematian. Di dalam al-quran dijelaskan bahwa sesuatu yang sekiranya membahayakan bagi manusia, alangkah baiknya untuk dihindari. Firman Allah SWT dalam Q.S al a'raf (7): 157 :

الَّذِينَ يَتَّبِعُونَ الرَّسُولَ النَّبِيَّ الْأُمِّيَّ الَّذِي يَجِدُونَهُ مَكْتُوبًا عِنْدَهُمْ فِي التَّوْرَةِ وَالْإِنْجِيلِ يَأْمُرُهُمْ بِالْمَعْرُوفِ وَيَنْهَاهُمْ عَنِ الْمُنْكَرِ وَيُحِلُّ لَهُمُ الطَّيِّبَاتِ وَيُحَرِّمُ عَلَيْهِمُ الْخَبَائِثَ وَيَضَعُ عَنْهُمْ إِصْرَهُمْ وَالْأَغْلَالَ الَّتِي كَانَتْ عَلَيْهِمْ فَالَّذِينَ ءَامَنُوا بِهِ وَعَزَّرُوهُ وَنَصَرُوهُ وَاتَّبَعُوا النُّورَ الَّذِي أُنزِلَ مَعَهُ ۗ أُولَٰئِكَ هُمُ الْمُفْلِحُونَ ﴿١٥٧﴾

“(Yaitu) orang-orang yang mengikut Rasul, Nabi yang ummi yang (namanya) mereka dapati tertulis di dalam Taurat dan Injil yang ada di sisi mereka, yang menyuruh mereka mengerjakan yang ma’ruf dan melarang mereka dari mengerjakan yang mungkar dan menghalalkan bagi mereka segala yang baik dan mengharamkan bagi mereka segala yang buruk dan membuang dari mereka beban-beban dan belenggu-belenggu yang ada pada mereka. Maka orang-orang yang beriman kepadanya, memuliakannya, menolongnya dan mengikuti cahaya yang terang yang diturunkan kepadanya (al quran), mereka itulah orang-orang yang beruntung” (Q.S al a'raf (7): 157).

Kalimat “mengharamkan bagi mereka segala yang buruk” memiliki arti bahwa sesuatu yang membahayakan bagi manusia itu wajib dihindari. Hal ini sebagai upaya tindakan pencegahan terhadap sesuatu yang membahayakan bagi

manusia. Panduan terhadap pencegahan penyakit dalam al quran maupun hadits telah banyak dijelaskan, seperti: *“Jagalah lima keadaan sebelum datang lima keadaan, diantaranya: jagalah kesehatanmu sebelum datang masa sakit”* (Al Hadits). *“Bila terjadi wabah di suatu tempat, maka penduduk setempat dilarang meninggalkan daerahnya dan orang luar dilarang berkunjung sampai wabah berlalu”*(Al Hadits). Inilah konsep isolasi daerah wabah yang sudah diajarkan Nabi Muhammad SAW sejak dahulu.

Dari beberapa hadits dan al quran diatas dapat kita lihat bahwa islam menganjurkan aspek pencegahan terhadap penyakit, karena biaya yang dikeluarkan untuk aspek pencegahan jauh lebih murah dibandingkan dengan pengobatan penyakit. Dan upaya pencegahan terhadap penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri *S. aureus* salah satunya adalah vaksinasi. Metode pembuatan vaksin yang digunakan adalah dengan pemanasan. Melalui pemanasan, bakteri dapat dilemahkan/dimatikan, hal ini dibuktikan dengan menurunnya viabilitas bakteri seiring dengan meningkatnya suhu dan waktu. Kemudian dilihat protein-protein yang berpotensi sebagai bahan vaksin, yakni protein yang bersifat antigen dengan berat molekul 10 kDa atau lebih, dan hasil yang didapatkan terlihat bahwa terjadi kenaikan tingkat ekspresi protein dilihat dari menebalnya band protein yang terekspresi seiring dengan meningkatnya suhu dan lama pemanasan. Tetapi, juga terdapat penurunan ekspresi protein ketika suhu dan waktu yang lebih ditinggikan, hal ini dimungkinkan karena bakteri yang masih bertahan hidup sedikit sehingga produksi protein jga semakin berkurang akibat terganggunya sistem biokimia dalam sel.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Suhu dan waktu pemanasan yang baik digunakan untuk melemahkan atau menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* adalah diatas suhu optimalnya (37 °C) dan dibawah suhu maksimumnya (60 °C).
2. Suhu dan lamanya pemanasan merupakan salah satu faktor lingkungan yang paling berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri. Terdapat pengaruh yang signifikan antara suhu dan lama pemanasan terhadap viabilitas bakteri *Staphylococcus aureus*, dimana terjadi penurunan tingkat pertumbuhan bakteri seiring dengan kenaikan suhu dan lamanya pemanasan.
3. Terjadi kenaikan serta penurunan ekspresi protein pada setiap perlakuan dilihat dari tebal dan tipisnya densitas protein yang terekspresi. Berat molekul protein yang diperoleh semuanya lebih dari 10 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa protein hasil pemanasan pada setiap perlakuan dapat digunakan sebagai bahan vaksin.

5.2 Saran

1. Lebih dijaga untuk tingkat keaseptisan lingkungan, bahan, dan alat penelitian agar tidak terjadi kontaminan terhadap bahan ataupun sampel penelitian.
2. Disarankan untuk melakukan uji in vivo terhadap hewan coba, untuk melihat respon imun dari hewan coba.

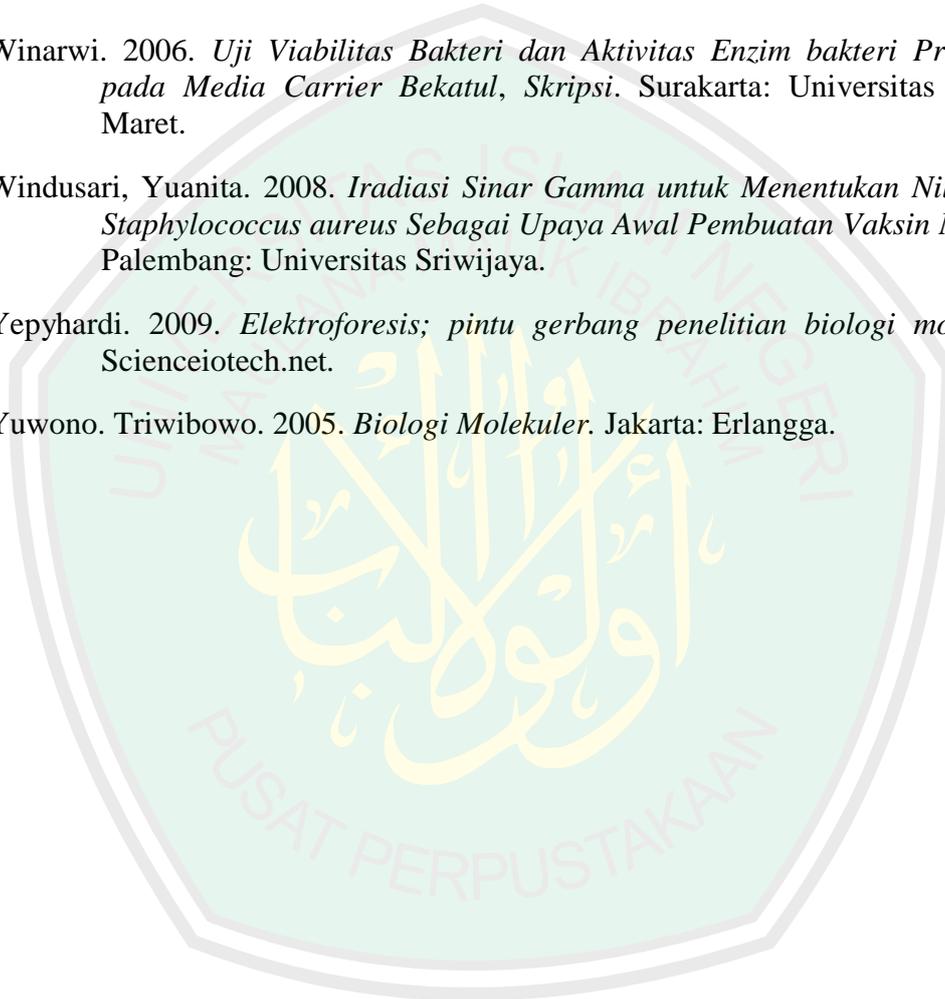
DAFTAR PUSTAKA

- Adln. 2013. <http://adln.lib.unair.ac.id/files/disk1/519/gdlhub-gdl-s1-2013-assidqikho-25942-16.lampi-n.pdf>. Surabaya: Perpustakaan Universitas Airlangga
- Alatas, Z. 2005. *Efek Paparan Radiasi pada Manusia*. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Keselamatan Radiasi dan Biomedika Nuklir, Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN).
- Bahraen, dr. Raehanul. 2011. *Pro Kontra Hukum Imunisasi dan Vaksinasi*. <http://muslim.or.id/fiqh-dan-muamalah/pro-kontra-hukum-imunisasi-dan-vaksinasi.html>. (diakses tanggal 27 April 2015).
- Bahraen, dr. Raehanul. 2012. *Fatwa Para Ulama, Ustadz, dan Ahli Medis Tentang Bolehnya Imunisasi*. <http://muslim.or.id/fiqh-dan-muamalah/fatwa-para-ulama-ustadz-dan-ahli-medis-tentang-bolehnya-imunisasi.html>. (diakses tanggal 27 April 2015).
- Baratawijadja. Karmen G. 2004. *Imunologi Dasar Edisi ke-6*. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Berg, J.M. dkk. 2002. *Biochemistry 5th Edition*. New York: W.H Freeman and Company.
- Davidson. 2001. *SDS PAGE*. <http://www.bio.davidson.edu/COURSES/GENOMICS/Method/SDSPAGE/SDSPAGE.html>. (diakses tanggal 2 November 2015).
- DeLeo FR, Diep BA, Otto M. 2009. *Host defense and pathogenesis in Staphylococcus aureus infections*. Infect Dis Clin North Am.
- Disyadi Nurkusuma, Dudy. 2009. *Faktor yang Berpengaruh Terhadap Kejadian Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Pada Kasus Infeksi Luka Pasca Operasi di Ruang Perawatan Bedah Rumah Sakit Kariadi Semarang*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Dowshen, et al, 2002. *Staphylococcus aureus*. <http://ud.ac.id/primahapsa/files/2012/06/jtptunimus-gdl-primahapsa-5337-1-bab1.pdf>. (diunduh pada tanggal 5 Februari 2015).
- DR. Maksun Radji, M. Biomed. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi : Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Fatchiyah. 2006. *Gel Elektroforesis*. Malang: Brawijaya Press.

- Gross R, Arico B, Rappuoli R. 1989. *Families of Bacterial Signal-Transducing Proteins*. Mol Microbiol, 3(11):1661–1667.
- Hemavathy, H. Asma, I. Dan Kirnpal. 2013. *Temperature-Regulated Expression of Membrane Protein in Sigella flexneri*, Gut Pathogens. Malaysia: BioMed Center.
- Ikhmalia, Hermanto, S., dan Sugoro, I. 2008. *Profil Protein Escherichia coli Hasil Inaktivasi Sinar Gamma*. Jakarta: Prosiding Seminar Nasional Biokimia, UI-Depok.
- Jewetz *et al.* 2004. *Medical Microbiology Twenty Third Edition, International edition*. New York: Mc Graw-Hill Companies.
- Jewetz *et al.* 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG.
- Lehninger. A.L. 1998. *Dasar-Dasar Biokimia*, Alih Bahasa Dr. Ir. Maggy Thenawidjaya, Institut Pertanian Bogor. Jakarta: Erlangga.
- Lehtolainen, Tanja. 2004. *Escherichia coli Mastitis Bacterial Factor and Host Response*. Finland: Department of Clinical Veterinary Sciences Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki.
- Lestari, Rina. 2013. *Pewarnaan Sederhana, Negatif, Kapsul, dan Gram*. Yogyakarta: STIK Yogyakarta.
- Lowy, F.D. 2014. *Staphylococcal Infections In: Harrison's Principles of Internal Medicine, 19th edition*. Editors: D. L. Longo, A. S. Fauci, D.L. Kasper, S. L. Hauser, J. L. Jameson and J. Loscalzo. The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. 2008. *Biology of Microorganisms 12th edition*. San Francisco: Pearson.
- Maherazain, S.Si, Lilil. 2014. *Pengaruh Perlakuan Medan Listrik Serta Waktu Paparan Terhadap Penurunan Bakteri Pseudomonas aeruginosa Pada Biofilm*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Pelczar, Michael. J *et al.* 2007. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 1*. Jakarta: UI Press.
- Pelczar, Michael. J *et al.* 2012. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 2*. Jakarta: UI Press.
- Poedjiadi A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Yogyakarta: UI Press.
- Prescott, L.M. *et al.*, 2002. *Micobiology*. 5th ed. New York: Mc Graw Hill.

- Rahmawati, Diana. 2009. *Pengaruh Vaksinasi Kultur Klebsiella pneumoniae Hasil Inaktivasi Pemanasan Dan Iradiasi Sinar Gamma Terhadap Kondisi Fisik Serta Profil Protein Serum Darah Mencit*. Skripsi. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah.
- Rochmah, S. N., Sri Widayati, M. Miah. 2009. *Biologi*. Jakarta: Pusat Perbukuan, Departemen Pendidikan Nasional.
- Safitri, Nur Maulida. 2014. *Membuat Larutan Mc Farland*. <http://perilaut.blogspot.co.id/2014/06/bagaimana-membuat-larutan-mc-farland.html> (diakses 15 September 2015).
- Serway, Raymond A. 2000. *Collage Physics: Tecnology Version 5th Edition*. Philadelphia: Saunders Collage Publishing.
- Simanjuntak, M.T dan I Silalahi. 2003. *Penuntun Prektikum Biokimia*. Sumatra Utara: FMIPA Jurusan Farmasi Universitas Sumatra Utara.
- Soeripto. 2002. *Pendekatan Konsep Kesehatan Hewan Melalui Vaksinasi*. Bogor: Jurnal Litbang Pertanian, 21 (2).
- Stoker, H. Stephen. 2010. *General Organic And Biological Chemistry Fifth Edition*. Belmont, CA USA: Cengage Learning.
- Stryer. Lubert. 2002. *Biokimia Edisi 4, Volume 1*. ECG. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.
- Sudjadi. 2008. *Bioteknologi Kesehatan*. Yogyakarta: UGM Press.
- Sugoro, Irawan. 2004. *Pengontrolan Penyakit Mastitis dan Manajemen Pemerahan Susu*. Artikel PATIR BATAN.
- Tetriana, D. dan Sugoro, I. 2007. *Aplikasi Nuklir dalam Bidang Vaksin*. Vol .2. Buletin ALARA.
- Tuasikal, B. J. 2006. *Instruksi Patologi Anatom Laboratorium Kesehatan dan Reproduksi Ternak*. Jakarta: PATIN-BATAN.
- Ummubalqis. 2000. *Karakterisasi Protease dari Ekskretori/Sekretori Stadium L₃ Ascaridia galli*. Bogor: IPB.
- Uversky, Vladimir. 2007. *Conformation Stability, Size, Shape, and Surface of Protein Molecules*. New York: Nova Science.
- Wahyono, H. 2010. *Resistensi Antibiotik*. Pidato pengukuhan Guru Besar Mikrobiologi FK UNDIP Semarang.

- Westermeier. 2004. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice*. New Jersey: John Wiley & Sons inc.
- Williams. 2001. *SDS Gel Electrophoresis*. http://web.chemistry.gatech.edu/~williams/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html.(diakses 2 November 2015).
- Winarno F.G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Cetakan ke-7. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Winarwi. 2006. *Uji Viabilitas Bakteri dan Aktivitas Enzim bakteri Proteolitik pada Media Carrier Bekatul, Skripsi*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Windusari, Yuanita. 2008. *Iradiasi Sinar Gamma untuk Menentukan Nilai LD₅₀ Staphylococcus aureus Sebagai Upaya Awal Pembuatan Vaksin Mastitis*. Palembang: Universitas Sriwijaya.
- Yepyardi. 2009. *Elektroforesis; pintu gerbang penelitian biologi molekuler*. Scienceiotech.net.
- Yuwono. Triwibowo. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.





LAMPIRAN

Lampiran 1 Data Hasil Penelitian

Data Hasil Uji Viabilitas Bakteri *Staphylococcus aureus*

Suhu (°C)	Waktu (menit)	Jumlah Bakteri (CFU/ml)			Rata-Rata (CFU/ml)	% Viabilitas
		P1	P2	P3		
Kontrol	0	142.10 ⁷	139.10 ⁷	132.10 ⁷	137,67.10 ⁷	99,99
40	10	76.10 ⁷	69.10 ⁷	72.10 ⁷	72,33.10 ⁷	52,54
	20	53.10 ⁷	50.10 ⁷	55.10 ⁷	52,67.10 ⁷	38,25
	30	36.10 ⁷	39.10 ⁷	32.10 ⁷	35,67.10 ⁷	25,91
45	10	63.10 ⁷	66.10 ⁷	59.10 ⁷	62,67.10 ⁷	45,52
	20	46.10 ⁷	40.10 ⁷	50.10 ⁷	45,33.10 ⁷	32,93
	30	30.10 ⁷	29.10 ⁷	31.10 ⁷	30,00.10 ⁷	21,79
50	10	54.10 ⁷	51.10 ⁷	48.10 ⁷	51,00.10 ⁷	37,04
	20	30.10 ⁷	37.10 ⁷	28.10 ⁷	31,67.10 ⁷	23,00
	30	26.10 ⁷	22.10 ⁷	24.10 ⁷	24,00.10 ⁷	17,43



Lampiran 2 Hasil Pengujian SPSS

SPSS Uji Normalitas

Hasil Uji Normalitas Antara Persentase Viabilitas dengan Pengaruh Suhu dan Waktu

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
jumlah bakteri	kontrol 10 menit	.269	3	.	.949	3	.567
	kontrol 20 menit	.269	3	.	.949	3	.567
	kontrol 30 menit	.269	3	.	.949	3	.567
	40 C 10 menit	.204	3	.	.993	3	.843
	40 C 20 menit	.219	3	.	.987	3	.780
	40 C 30 menit	.204	3	.	.993	3	.843
	45 C 10 menit	.204	3	.	.993	3	.843
	45 C 20 menit	.219	3	.	.987	3	.780
	45 C 30 menit	.175	3	.	1.000	3	1.000
	50 C 10 menit	.175	3	.	1.000	3	1.000
	50 C 20 menit	.304	3	.	.907	3	.407
	50 C 30 menit	.175	3	.	1.000	3	1.000

a. Lilliefors Significance Correction

SPSS Uji *Univariate Analysis Of Variance* (Anova) two-way.

Hasil Analisa Uji Anova Pengaruh Suhu dan Waktu Terhadap Viabilitas Bakteri

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: jumlah bakteri

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	231589.000 ^a	12	19299.083	1.259E3	.000
suhu	59387.194	3	19795.731	1.291E3	.000
waktu	3513.389	2	1756.694	114.567	.000
suhu * waktu	1271.056	6	211.843	13.816	.000
Error	368.000	24	15.333		
Total	231957.000	36			

a. R Squared = ,998 (Adjusted R Squared = ,998)

Hasil Uji Post Hoc Test Duncan Viabilitas Bakteri *S. aureus* Dengan Variasi Waktu

jumlah bakteri

Duncan								
suhu dan lama inkubasi bakteri	N	Subset						
		1	2	3	4	5	6	7
50 C 30 menit	3	24.00						
45 C 30 menit	3	30.00	30.00					
50 C 20 menit	3		31.67					
40 C 30 menit	3		35.67					
45 C 20 menit	3			45.33				
50 C 10 menit	3			51.00	51.00			
40 C 20 menit	3				52.67			
45 C 10 menit	3					62.67		
40 C 10 menit	3						72.33	
kontro 10 menit	3							137.67
kontrol 20 menit	3							137.67
kontrol 30 menit	3							137.67
Sig.		.073	.106	.089	.607	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 15,333.

Lampiran 3 Perhitungan Berat Molekul

1. SLAB 1 (Suhu 40 °C, 10 menit)

Bm	`log BM	Tracking	Rf
17	1,23	51,00	0,91
10	1,00	56,00	1,00
15,29		52,00	0,93
	0,80	0,23	1,18

Bm	`log BM	Tracking	Rf
42	1,62	29,00	0,52
34	1,53	34,00	0,61
40,26		30,00	0,54
	0,80	0,09	1,60

Bm	`log BM	Tracking	Rf
26	1,41	40,00	0,71
17	1,23	51,00	0,91
22,28		44,00	0,79
24,07		42,00	0,75
25,70		40,00	0,71
	0,64	0,18	1,35
	0,82	0,18	1,38
	1	0,18	1,41

Bm	`log BM	Tracking	Rf
52	1,72	24,00	0,43
42	1,62	29,00	0,52
43,83		28,00	0,50
	0,20	0,09	1,64

Bm	`log BM	Tracking	Rf
260	2,41	6,00	0,11
140	2,15	10,00	0,18
222,72		7,00	0,13
	0,75	0,27	2,35

2. SLAB 2 (Suhu 40 °C, 20 menit)

Bm	`log BM	Tracking	Rf
17	1,23	51,00	0,91
10	1,00	56,00	1,00
15,29		52,00	0,93
	0,80	0,23	1,18

Bm	`log BM	Tracking	Rf
34	1,53	34,00	0,61
26	1,41	40,00	0,71
28,43		38,00	0,68
	0,33	0,12	1,45

Bm	`log BM	Tracking	Rf
26	1,41	40,00	0,71
17	1,23	51,00	0,91
17,67		50,00	0,89
19,09		48,00	0,86
23,18		43,00	0,77
25,01		41,00	0,73
	0,09	0,18	1,25
	0,27	0,18	1,28
	0,73	0,18	1,365152
	0,909091	0,18	1,398198

Bm	`log BM	Tracking	Rf
52	1,72	24,00	0,43
42	1,62	29,00	0,52
43,83		28,00	0,50
49,83		25,00	0,45
	0,20	0,09	1,64
	0,8	0,09	1,697453

Bm	`log BM	Tracking	Rf
72	1,86	18,00	0,32
52	1,72	24,00	0,43
57,96		22,00	0,39
	0,33	0,14	1,76

3. SLAB 3 (Suhu 40 °C, 30 menit)

Bm	`log BM	Tracking	Rf
17	1,23	51,00	0,91
10	1,00	56,00	1,00
15,29		52,00	0,93
	0,80	0,23	1,18

Bm	`log BM	Tracking	Rf
26	1,41	40,00	0,71
17	1,23	51,00	0,91
17,67		50,00	0,89
24,07		42,00	0,75
25,01		41,00	0,73
26,00		40,00	0,71
	0,09	0,18	1,25
	0,82	0,18	1,38
	0,909091	0,18	1,398198
	1	0,18	1,414973

Bm	`log BM	Tracking	Rf
34	1,53	34,00	0,61
26	1,41	40,00	0,71
28,43		38,00	0,68
29,73		37,00	0,66
31,09		36,00	0,64
32,51		35,00	0,63
	0,33	0,12	1,45
	0,50	0,12	1,47
	0,666667	0,12	1,492644
	0,833333	0,12	1,512061

Bm	`log BM	Tracking	Rf
52	1,72	24,00	0,43
42	1,62	29,00	0,52
42,00		29,00	0,52
49,83		25,00	0,45
	0,00	0,09	1,62
	0,8	0,09	1,697453

Bm	`log BM	Tracking	Rf
72	1,86	18,00	0,32
52	1,72	24,00	0,43
54,90		23,00	0,41
61,19		21,00	0,38
	0,17	0,14	1,74
	0,5	0,14	1,786668

Bm	`log BM	Tracking	Rf
95	1,98	14,00	0,25
72	1,86	18,00	0,32
77,17		17,00	0,30
	0,25	0,12	1,89

Bm	`log BM	Tracking	Rf
260	2,41	6,00	0,11
140	2,15	10,00	0,18
140,00		10,00	0,18
	0,00	0,27	2,15

4. SLAB 4 (Suhu 45 °C, 10 menit)

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
17	1,23	51,00	0,91
10	1,00	56,00	1,00
15,29		52,00	0,93
	0,80	0,23	1,18

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
34	1,53	34,00	0,61
26	1,41	40,00	0,71
28,43		38,00	0,68
31,09		36,00	0,64
32,51		35,00	0,63
	0,33	0,12	1,45
	0,67	0,12	1,49
	0,833333	0,12	1,512061

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
26	1,41	40,00	0,71
17	1,23	51,00	0,91
17,67		50,00	0,89
19,09		48,00	0,86
23,16		43,00	0,77
25,01		41,00	0,73
26,00		40,00	0,71
	0,09	0,18	1,25
	0,27	0,18	1,28
	0,727273	0,18	1,364649
	0,909091	0,18	1,398198
	1	0,18	1,414973

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
52	1,72	24,00	0,43
42	1,62	29,00	0,52
43,83		28,00	0,50
49,83		25,00	0,45
	0,20	0,09	1,64
	0,8	0,09	1,697453

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
72	1,86	18,00	0,32
52	1,72	24,00	0,43
61,19		21,00	0,38
	0,50	0,14	1,79

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
260	2,41	6,00	0,11
140	2,15	10,00	0,18
190,79		8,00	0,14
	0,50	0,27	2,28

5. SLAB 5 (Suhu 45 °C, 20 menit)

Bm	`log BM	Tracking	Rf
17	1,23	51,00	0,91
10	1,00	56,00	1,00
15,29		52,00	0,93
	0,80	0,23	1,18

Bm	`log BM	Tracking	Rf
42	1,62	29,00	0,52
34	1,53	34,00	0,61
35,47		33,00	0,59
38,60		31,00	0,55
	0,20	0,09	1,55
	0,6	0,09	1,586541

Bm	`log BM	Tracking	Rf
26	1,41	40,00	0,71
17	1,23	51,00	0,91
17,67		50,00	0,89
19,09		48,00	0,86
20,62		46,00	0,82
23,16		43,00	0,77
24,07		42,00	0,75
25,01		41,00	0,73
26,00		40,00	0,71
	0,09	0,18	1,25
	0,27	0,18	1,28
	0,454545	0,18	1,314324
	0,727273	0,18	1,364649
	0,818182	0,18	1,381423
	0,909091	0,18	1,398198
	1	0,18	1,414973

Bm	`log BM	Tracking	Rf
52	1,72	24,00	0,43
42	1,62	29,00	0,52
43,83		28,00	0,50
47,74		26,00	0,46
	0,20	0,09	1,64
	0,6	0,09	1,678902

Bm	`log BM	Tracking	Rf
72	1,86	18,00	0,32
52	1,72	24,00	0,43
61,19		21,00	0,38
72,00		18,00	0,32
	0,50	0,14	1,79
	1	0,14	1,857332

Bm	`log BM	Tracking	Rf
34	1,53	34,00	0,61
26	1,41	40,00	0,71
28,43		38,00	0,68
29,73		37,00	0,66
32,51		35,00	0,63
	0,33	0,12	1,45
	0,50	0,12	1,47
	0,833333	0,12	1,512061

Bm	`log BM	Tracking	Rf
95	1,98	14,00	0,25
72	1,86	18,00	0,32
95,00		14,00	0,25
82,70		16,00	0,29
	1,00	0,12	1,98
	0,5	0,12	1,917528

Bm	\log BM	Tracking	Rf
140	2,15	10,00	0,18
95	1,98	14,00	0,25
140,00		10,00	0,18
	1,00	0,17	2,15



6. SLAB 6 (Suhu 45 °C, 30 menit)

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
17	1,23	51,00	0,91
10	1,00	56,00	1,00
15,29		52,00	0,93
17,00		51,00	0,91
	0,80	0,23	1,18
	1	0,23	1,230449

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
26	1,41	40,00	0,71
17	1,23	51,00	0,91
17,67		50,00	0,89
19,09		48,00	0,86
20,62		46,00	0,82
24,07		42,00	0,75
	0,09	0,18	1,25
	0,27	0,18	1,28
	0,454545	0,18	1,314324
	0,818182	0,18	1,381423

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
34	1,53	34,00	0,61
26	1,41	40,00	0,71
27,19		39,00	0,70
	0,17	0,12	1,43

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
52	1,72	24,00	0,43
42	1,62	29,00	0,52
43,83		28,00	0,50
47,74		26,00	0,46
	0,20	0,09	1,64
	0,6	0,09	1,678902

7. SLAB 7 (Suhu 50 °C, 10 menit)

Bm	`log BM	Tracking	Rf
17	1,23	51,00	0,91
10	1,00	56,00	1,00
15,29		52,00	0,93
17,00		51,00	0,91
	0,80	0,23	1,18
	1	0,23	1,230449

Bm	`log BM	Tracking	Rf
26	1,41	40,00	0,71
17	1,23	51,00	0,91
18,37		49,00	0,88
19,84		47,00	0,84
25,01		41,00	0,73
26,00		40,00	0,71
	0,18	0,18	1,26
	0,36	0,18	1,30
	0,909091	0,18	1,398198
	1	0,18	1,414973

Bm	`log BM	Tracking	Rf
34	1,53	34,00	0,61
26	1,41	40,00	0,71
28,43		38,00	0,68
29,73		37,00	0,66
31,09		36,00	0,64
34,00		34,00	0,61
	0,33	0,12	1,45
	0,50	0,12	1,47
	0,666667	0,12	1,492644
	1	0,12	1,531479

Bm	`log BM	Tracking	Rf
52	1,72	24,00	0,43
42	1,62	29,00	0,52
49,83		25,00	0,45
	0,80	0,09	1,70

Bm	`log BM	Tracking	Rf
72	1,86	18,00	0,32
52	1,72	24,00	0,43
54,90		23,00	0,41
72,00		18,00	0,32
	0,17	0,14	1,74
	1	0,14	1,857332

Bm	`log BM	Tracking	Rf
140	2,15	10,00	0,18
95	1,98	14,00	0,25
140,00		10,00	0,18
	1,00	0,17	2,15

8. SLAB 8 (Suhu 50 °C, 20 menit)

Bm	`log BM	Tracking	Rf
17	1,23	51,00	0,91
10	1,00	56,00	1,00
12,36		54,00	0,96
13,75		53,00	0,95
	0,40	0,23	1,09
	0,6	0,23	1,138269

Bm	`log BM	Tracking	Rf
26	1,41	40,00	0,71
17	1,23	51,00	0,91
17,67		50,00	0,89
19,09		48,00	0,86
20,62		46,00	0,82
25,01		41,00	0,73
26,00		40,00	0,71
	0,09	0,18	1,25
	0,27	0,18	1,28
	0,454545	0,18	1,314324
	0,909091	0,18	1,398198
	1	0,18	1,414973

Bm	`log BM	Tracking	Rf
34	1,53	34,00	0,61
26	1,41	40,00	0,71
27,19		39,00	0,70
28,43		38,00	0,68
29,73		37,00	0,66
32,51		35,00	0,63
34,00		34,00	0,61
	0,17	0,12	1,43
	0,33	0,12	1,45
	0,5	0,12	1,473226

	0,833333	0,12	1,512061
	1	0,12	1,531479

Bm	`log BM	Tracking	Rf
42	1,62	29,00	0,52
34	1,53	34,00	0,61
40,26		30,00	0,54
42,00		29,00	0,52
	0,80	0,09	1,60
	1	0,09	1,623249

Bm	`log BM	Tracking	Rf
52	1,72	24,00	0,43
42	1,62	29,00	0,52
47,74		26,00	0,46
	0,60	0,09	1,68

Bm	`log BM	Tracking	Rf
72	1,86	18,00	0,32
52	1,72	24,00	0,43
61,19		21,00	0,38
72,00		18,00	0,32
	0,50	0,14	1,79
	1	0,14	1,857332

Bm	`log BM	Tracking	Rf
140	2,15	10,00	0,18
95	1,98	14,00	0,25
140,00		10,00	0,18
	1,00	0,17	2,15

9. SLAB 9 (Suhu 50 °C, 30 menit)

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
17	1,23	51,00	0,91
10	1,00	56,00	1,00
12,36		54,00	0,96
13,75		53,00	0,95
	0,40	0,23	1,09
	0,6	0,23	1,138269

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
34	1,53	34,00	0,61
26	1,41	40,00	0,71
31,09		36,00	0,64
34,00		34,00	0,61
	0,666667	0,12	1,492644
	1	0,12	1,531479

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
26	1,41	40,00	0,71
17	1,23	51,00	0,91
17,67		50,00	0,89
23,16		43,00	0,77
26,00		40,00	0,71
	0,09	0,18	1,25
	0,73	0,18	1,36
	1	0,18	1,414973

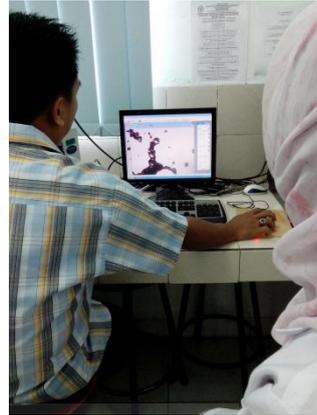
Bm	\`log BM	Tracking	Rf
42	1,62	29,00	0,52
34	1,53	34,00	0,61
40,26		30,00	0,54
42,00		29,00	0,52
	0,80	0,09	1,60
	1	0,09	1,623249

Bm	\`log BM	Tracking	Rf
52	1,72	24,00	0,43
42	1,62	29,00	0,52
49,83		25,00	0,45
45,75		27,00	0,48
	0,80	0,09	1,70
	0,4	0,09	1,660351

Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian



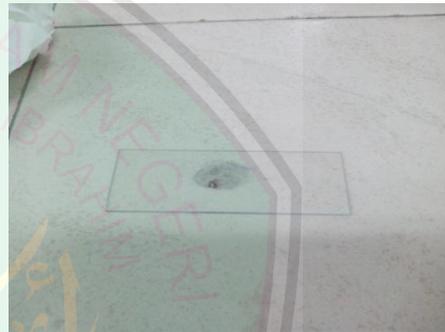
Hasil Peremajaan Bakteri pada Medium NA padat



Pengamatan morfologi menggunakan mikroskop inferted



Zat pewarna dalam pewarnaan gram



Preparat bakteri hasil pewarnaan gram



Penumbuhan bakteri menggunakan inkubator shacker



Hasil dari Penumbuhan bakteri menggunakan inkubator shacker



Alat dan bahan yang digunakan dalam pengenceran bakteri (uji viabilitas)



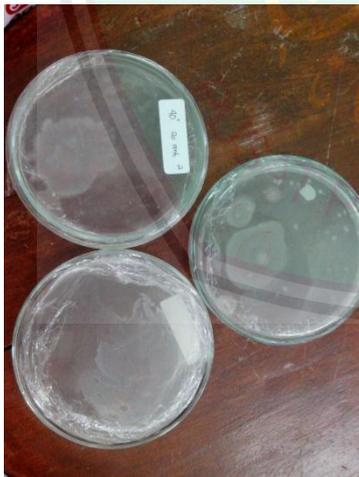
Sentrifuge dengan menggunakan suhu dingin



Proses pemvortekan



Alat dan bahan yang digunakan dalam pencucian pelet



Hasil uji viabilitas setelah dihitung menggunakan coloni counter



Pembuatan gel elektroforesis



Proses memasukkan sampel kedalam gel elektroforesis



Sampel dipanaskan di air mendidih untuk mengoptimalkan denaturasi protein.



Proses running



Proses Staining dan Distaining